

# **Design, rekombinante Produktion und Anwendung von Muschelfußprotein und Elastin-ähnlichen Fusionsproteinen**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

**Frau M.Sc. Constanze Zwies**

geb. am 16.03.1991 in Halberstadt

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus Pietzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Groth
3. Gutachter: Prof. Dr. Christoph Syldatk

Tag der öffentlichen Verteidigung: 08.05.2023

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Constanze Zwies, an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, dass keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind.

Die Dissertation hat in der gegenwärtigen bzw. in einer anderen Fassung noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

---

Halle, Datum

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe Aufarbeitung biotechnischer Produkte des Instituts für Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Pietzsch angefertigt. Die ersten Zeilen möchte ich dazu nutzen, all denjenigen meinen Dank auszusprechen, die mich während meiner Zeit als Doktorandin begleitet und zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Markus Pietzsch für die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner Leitung anzufertigen. Dies gab mir die Möglichkeit, viele neue Methoden im Bereich der Materialwissenschaften zu erlernen und mich weiterzuentwickeln. Ebenfalls danke ich ihm für die vielen hilfreichen Diskussionen, die Einbringung kreativer Ideen und konstruktiver Vorschläge, die Möglichkeit zur Verwirklichung eigener Pläne und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Frau Dr. Franziska Seifert, dir möchte ich für deine fachliche Unterstützung im Labor als auch bei unseren zahlreichen Diskussionen danken, deinen wissenschaftlichen Ideenreichtum, deine immerwährende Motivation und deine wertvollen Ratschläge. Diese Zeit hat einen wesentlichen Beitrag zu meiner fachlichen, wie persönlichen Entwicklung geleistet und dafür bin ich dir sehr dankbar.

An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei der gesamten AG-Pietzsch und den Mitarbeitern im Designer-Projekt für die immerwährende Unterstützung, die große Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik bedanken. Darüber hinaus danke ich allen für die angenehme und immer lustige Arbeitsatmosphäre und die gemeinsamen Stammtische fernab des Arbeitsalltags. Insbesondere danke ich Anne und Maria, die mich über die gesamte Zeit der Promotion und darüber hinaus in der gemeinsamen Elternzeit begleitet und motiviert haben. Meinen lieben Bürokolleginnen Martina und Andrea danke ich für das tolle Arbeitsklima, euren Zuspruch und für eure Unterstützung im Labor bei den Fermentationen.

An der vorliegenden Arbeit haben insgesamt 6 Masterstudenten (Ángela Vargas, Hilke Buß, Merve Eker, Umme Uzma Haveri, Suttinee Santa-ardharnpreecha, Tamaradobra Selekere) mitgewirkt. Euch allen gilt mein Dank für eure tatkräftige Hilfe im Labor und eure Offenheit Neues erlernen zu wollen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit habe ich mit verschiedenen universitären und außeruniversitären Arbeitsgruppen zusammengearbeitet. An dieser Stelle möchte ich mich bei den Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit konstruktiv beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Thomas Groth von der AG Biomedizinische Materialien der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Bereitstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Quarzkristall-Mikrowaage (QCM), sowie für die anregenden Gespräche und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Nico Teuscher vom Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen (IMWS) in Halle für die Oberflächenreinigung der Quarzsensoren für die QCM Messungen und das zunächst etablierte Reinigungsprotokoll.

Herrn Dr. Bodo Fuhrmann vom Interdisziplinären Zentrum für Materialwissenschaften (IZM) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Laborbereich Lithographie, für die Analyse der

Oberflächen der Quarzsensoren und der Mica-Platten bedanken und den darauf stattgefundenen fachlichen Austausch.

Herrn Dr. Eike Busmann aus der Abteilung Pharmazeutische Technologie (AG Prof. Dr. Karsten Mäder) für die Durchführung der DLS-Experimente.

Frau Dr. Angelika Schierhorn von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. Marcel Naumann vom Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI-MWT Halle (Saale) für die durchgeführten massenspektrometrischen Analysen der Designer-Proteine sowie für die ausgiebigen fachlichen Diskussionen.

Herrn Dr. Stefan Kubick und Frau Dipl.-Ing. Doreen Wüstenhagen vom Fraunhofer für Zelltherapie und Immunologie IZI-BB danke ich für die Zusammenarbeit an den Studien zur Zellfreien Proteinsynthese von DP1A.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken. Meinen Eltern möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Mit eurem Zuspruch, der mentalen aber auch finanziellen Unterstützung während meiner gesamten Studienzzeit habt ihr einen bedeutenden Anteil zu dem Gelingen meiner Promotion beigetragen. Euch gilt meine Anerkennung und tiefster Dank.

Zu guter Letzt (doch eigentlich an erster Stelle) möchte ich Felix danken. Ohne deinen Rückhalt, deine Geduld, deine Liebe und grenzenlose Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht erfolgreich abschließen können. Du hast mir nicht nur motivierend zur Seite gestanden, sondern mir die Kraft gegeben, um das alles zu schaffen. DANKE für alles.

## Abkürzungen

Ab	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
HAc	Essigsäure
AFM	Rasterkraftmikroskop, engl. <i>atomic force microscopy</i>
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
A <sub>spez</sub>	Spezifische Aktivität
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP/NBT	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat/ <i>Nitro blue tetrazolium</i>
BFM	Biofeuchtmasse
BTM	Biotrockenmasse
bp	Basenpaar
BR	Bioreaktor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Circulardichroismus
CFPS	Zellfreie Proteinsynthese, engl. <i>cell-free protein synthesis</i>
CLP	ATP-abhängige Clp Protease, engl. „ <i>caseinolytic protease</i> “
CPD	Computergestützte Protein-Design
CV	Säulenvolumen, engl. <i>column volume</i>
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser
DFT	Dichtefunktionaltheorie, engl. <i>density functional theory</i>
DLS	Dynamische Lichtstreuung, engl. <i>Dynamic light scattering</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
DP	Designer-Protein
DSF	engl. <i>differential scanning fluorimetry</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDX	Energiedispersive Röntgenmikroanalyse, engl. <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, engl. <i>Epidermal growth factor</i>
ELP	Elastin-ähnliches Polypeptid, engl. <i>Elastin-like peptides</i>
engl.	englisch
EtOH	Ethanol
GdmCl	Guanidinhydrochlorid
GFP	Grün fluoreszierendes Protein, engl. <i>green fluorescent protein</i>
HDH	Hochdruckhomogenisator
HK	Hauptkultur
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie, engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HyP	Hydroxyprolin

---

HyR	Hydroxyarginin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle, engl. <i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
ISD	Spontan-Fragmentierung, engl. <i>in-source decay</i>
ITC	engl. <i>Inverse transition cycling</i>
k.A.	keine Angaben
Kan	Kanamycin
$k_{cat}$	Wechselzahl
KCl	Kaliumchlorid
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
LCST	niedrige kritische Lösungstemperatur, engl. <i>lower critical solution temperature</i>
LB	Komplexmedium zur Kultivierung von <i>E. coli</i> , engl. <i>lysogeny broth</i>
LRR	Leucin-reicher Sequenzabschnitt, engl. <i>Leucine rich repeat</i>
M	Marker
MD	Molekulardynamik, engl. <i>molecular dynamics</i>
<i>M. edulis</i>	<i>Mytilus edulis</i>
Mfp	Muschelfußproteine
Mfp-3	Muschelfußprotein 3
<i>M. galloprovincialis</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
MM	Minimalmedium
mod.	modifiziert (Hydroxylierung der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA)
MS	Massenspektrometrie / Massenspektrometer
mTyr	mikrobielle Tyrosinase
MW	Molekularmasse, engl. <i>Molecular weight</i>
MWCO	Molekularmassengrenzwert, engl. <i>molecular weight cut-off</i>
n	Anzahl verglichener oder bestimmter Werte
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, engl. <i>Nitro blue tetrazolium</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
OF	Oberfläche
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
PDI	Polydispersitätsindex
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPII	Polyprolin-II-Helix
PPL	vorgefärbte Proteinleiter, engl. <i>prestained protein ladder</i>
pSer	Phosphoserin
QCM-D	Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors, engl. <i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring</i>
Q-TOF MS	Quadrupole <i>time-of-flight</i> , MS Detektor
RE	Rohextrakt
RT	Raumtemperatur
SD	Einzeldomäne, engl. <i>single domain</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFA	<i>Surface-Force-Apparatur</i> , engl. <i>surface force apparatus</i>

SFG	Summenfrequenzspektroskopie, engl. <i>sum frequency generation</i>
SK	Schüttelkolben
SUMO	engl. <i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
Tab.	Tabelle
TB	engl. <i>terrific broth</i>
TE	Tropoelastin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEV	engl. <i>tobacco etch virus</i>
TIM	Triosephosphat-Isomerase
TOPA	3,4,5-Trihydroxyphenylalanin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T <sub>t</sub>	Übergangstemperatur, engl. <i>transition temperature</i>
UV	Ultraviolett
VK	Vorkultur
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit nach Michaelis-Menten-Kinetik
<i>V. spinosum</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>
(v/v)	Volumenprozent, engl. <i>volume per volume</i>
(w/v)	Masseprozent, engl. <i>weight per volume</i>

## Anmerkungen und Begriffsklärung

- I. Fachausdrücke aus der englischen Sprache ohne eine passende deutsche Entsprechung werden in der vorliegenden Arbeit kursiv geschrieben.
- II. In der vorliegenden Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum (Forscher, Kollegen, etc.) verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.
- III. In der vorliegenden Arbeit werden Designer-Proteine, deren Peptid-gebundene Tyrosine zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydroxyliert wurden, zur Einfachheit als „modifiziert“ (mod.) bezeichnet.
- IV. Der Begriff „Expression“ wird für die Transkription und Translation während der Biosynthese von Proteinen verwendet.

# Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung .....	II
Danksagung.....	III
Abkürzungen .....	V
Anmerkungen und Begriffsklärung.....	7
Inhaltsverzeichnis .....	VIII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Protein-Design.....	4
1.2 Inspiration aus der Natur .....	6
1.3 Funktionsbasiertes Design der Proteine für materialwissenschaftliche Anwendungen	9
1.3.1 Grundidee.....	9
1.4 Protein-Blöcke in Biomaterialien .....	10
1.4.1 Adhäsive Protein-Blöcke.....	11
1.4.1.1 Muschelfußproteine.....	12
1.4.1.1.1 Muschelfußprotein-3 (Mfp-3) .....	14
1.4.1.1.2 DOPA als Schlüsselmolekül natürlicher Adhäsion.....	15
1.4.1.1.3 Enzymatische Hydroxylierung von Tyrosinen in Mfp-basierten Biomaterialien .....	17
1.4.2 Kohäsive Protein-Blöcke.....	18
1.4.2.1 Elastin-ähnliche Sequenzen.....	20
1.4.3 Linker-Sequenz als Protein-Baustein .....	22
1.4.4 Protein- <i>tags</i> als Protein-Bausteine.....	22
1.5 Herausforderungen bei der Produktion rekombinanter Proteine .....	22
1.6 Motivation.....	23
1.7 Zielsetzung.....	23
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1 Material .....	25
2.1.1 Chemikalien.....	25
2.1.2 Stammlösungen.....	27
2.1.3 Puffer und Medien .....	27
2.1.4 Enzyme und Kits für die Molekularbiologie.....	28
2.1.5 Genkonstrukte und Plasmide .....	28
2.1.6 Marker und Antikörper .....	28
2.1.7 Bakterielle Stämme.....	29
2.1.7.1 <i>Escherichia coli</i> BW3110.....	29
2.1.7.2 <i>Escherichia coli</i> KRX.....	29
2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	29

---

2.2 Methoden .....	32
2.2.1 <i>In silico</i> Recherche .....	32
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.2.1 Gensynthese.....	33
2.2.2.2 Klonierung der Expressionsplasmide für die Mfp-3-Einzeldomänen	33
2.2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
2.2.2.2.2 Restriktionsverdau .....	34
2.2.2.2.3 Ligation .....	34
2.2.2.2.4 Sequenzierung.....	34
2.2.2.3 Transformation von <i>E. coli</i> .....	35
2.2.2.3.1 Hitzeschock-Methode.....	35
2.2.2.3.2 Elektroporation .....	35
2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA.....	36
2.2.2.5 Quantifizierung von DNA.....	36
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	36
2.2.3 Heterologe Produktion .....	36
2.2.3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	36
2.2.3.1.1 Schüttelkolbenmaßstab.....	36
2.2.3.1.2 Bioreaktormaßstab.....	37
2.2.3.2 Zellaufschluss .....	38
2.2.3.2.1 Mechanischer Zellaufschluss .....	38
2.2.3.2.2 Enzymatischer Zellaufschluss .....	39
2.2.4 Proteinchemische Methoden .....	39
2.2.4.1 SDS-PAGE .....	39
2.2.4.2 Western-Blot .....	40
2.2.5 Reinigung der Proteine .....	40
2.2.5.1 Chromatografische Proteinreinigung .....	40
2.2.5.1.1 Reinigung von His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 und His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3.....	40
2.2.5.1.2 Reinigung der mikrobiellen Tyrosinase.....	41
2.2.5.1.3 Reinigung von DP1A/B.....	42
2.2.5.2 Reinigung von DP1A und DP1B mittels <i>Inverse transition cycling</i> (ITC).....	42
2.2.5.3 Gefriertrocknung (Lyophilisation).....	43
2.2.6 Analytik.....	43
2.2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung .....	43
2.2.6.1.1 Bradford .....	43
2.2.6.1.2 BCA-Assay.....	43

2.2.6.1.3	Absorption bei 280 nm .....	44
2.2.6.2	Ermittlung des Temperaturübergangs mittels nanoDSF .....	44
2.2.6.3	Messung der dynamischen Lichtstreuung .....	45
2.2.6.4	Analyse der His <sub>6</sub> -mTyr Aktivität .....	45
2.2.6.4.1	Kontinuierlicher photometrischer Aktivitätstest .....	45
2.2.6.4.2	In vitro Modifikation der Designer-Proteine .....	46
2.2.6.4.3	Qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung .....	47
2.2.6.4.4	Bestimmung der Hydroxylierungen mittels Massenspektrometrischer Analyse .....	47
2.2.6.5	Edman-Sequenzierung .....	48
2.2.7	Materialwissenschaftliche Untersuchungen .....	48
2.2.7.1	Untersuchungen zur Proteinadsorption (QCM-D Messungen) .....	48
2.2.7.2	Zug-Scher-Versuche .....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
3.1	Muschelfußprotein-3-basierte Fusions-Bibliothek .....	51
3.1.1.1	Adhäsive Einzelblöcke .....	52
3.1.1.2	DP1-Proteine .....	52
3.1.1.3	DP2-Proteine .....	52
3.2	Heterologe Proteinproduktion inklusive Aufarbeitung .....	53
3.2.1	Mikrobielle Tyrosinase als Werkzeug-Enzym zur Modifikation der Designer-Proteine .....	53
3.2.1.1	Heterologe Produktion in <i>E. coli</i> .....	53
3.2.1.2	Chromatografische Reinigung der mikrobiellen Tyrosinase .....	54
3.2.1.3	Nachweis der enzymatischen Aktivität .....	55
3.2.1.3.1	Photometrischer Nachweis der Tyrosinase-Aktivität .....	55
3.2.1.3.2	Vorversuch für den qualitativen Nachweis der Tyrosinase-Aktivität für die Substrate L-Tyrosin und His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 .....	57
3.2.2	His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 und His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3 .....	58
3.2.2.1	Heterologe Produktion der Muschelfußproteine-3 im Bioreaktormaßstab .....	59
3.2.2.2	Proteinaufarbeitung .....	61
3.2.2.2.1	Chromatografische Proteinreinigung .....	61
3.2.2.2.2	Enzymatische Abspaltung des His <sub>6</sub> -SUMO-tags .....	62
3.2.2.3	<i>In vitro</i> Modifikation der gereinigten Mfp-3 .....	64
3.2.2.3.1	In vitro Modifikation und qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung .....	64
3.2.2.3.2	Bestimmung des Modifizierungsgrades mittels Massenspektrometrie .....	65

---

3.2.3	Designer-Protein 1A/B – Variante .....	67
3.2.3.1	Heterologe Produktion in <i>E. coli</i> .....	68
3.2.3.1.1	Heterologe Produktion im Schüttelkolbenmaßstab .....	68
3.2.3.1.2	Heterologe Produktion in <i>E. coli</i> im Bioreaktormaßstab .....	68
3.2.3.2	Reinigung der DP1-Proteine .....	70
3.2.3.2.1	Chromatografische Aufarbeitung der DP1-Proteine .....	70
3.2.3.2.2	Reinigung der DP1-Proteine mittels Inverse transition cycling .....	74
3.2.3.3	<i>In vitro</i> Modifikation der DP1-Varianten mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase .....	80
3.2.3.3.1	Qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung .....	80
3.2.3.3.2	Bestimmung des Modifizierungsgrades mittels Massenspektrometrie .....	81
3.2.4	Designer-Protein 2 .....	84
3.2.4.1	Heterologe Produktion in <i>E. coli</i> .....	84
3.2.4.1.1	Heterologe Produktion im Schüttelkolbenmaßstab .....	84
3.2.4.1.2	Heterologe Produktion im Bioreaktormaßstab .....	84
3.2.4.2	Reinigung von DP2 mittels ITC .....	85
3.2.4.3	<i>In vitro</i> Modifikation von DP2 mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase .....	87
3.2.4.3.1	Qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung .....	87
3.2.4.3.2	Bestimmung des Modifizierungsgrades mittels Massenspektrometrie .....	88
3.3	Funktionelle Charakterisierung der Designer-Proteine .....	90
3.3.1	Thermodynamische Untersuchungen zur Stabilität der Designer-Proteine mittels nanoDSF ( <i>differential scanning fluorimetry</i> ) .....	91
3.3.2	Untersuchung der Proteinadsorption der Designer-Proteine mittels QCM-D .....	96
3.3.2.1	Untersuchungen zum Einfluss der Konzentration .....	97
3.3.2.2	Untersuchungen zum Einfluss der Applikationszeit .....	99
3.3.2.3	Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur .....	100
3.3.2.4	Vergleichende Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Designer-Proteinen auf SiO <sub>2</sub> -Oberflächen .....	102
3.3.2.4.1	Untersuchungen zur Proteinadsorption der Designer-Proteine .....	102
3.3.2.4.2	Untersuchungen zum Dissipationsverhalten der Designer-Proteine .....	105
3.3.3	Untersuchungen zu den Klebeeigenschaften der Designer-Proteine im Zug-Scher-Versuch .....	109
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>114</b>
4.1	Rekombinante Produktion von Mfp-3 und ELP-basierten Proteinen .....	115

---

4.1.1	Rekombinante Produktion von Mfp-3-Proteinen.....	115
4.1.2	Rekombinante Produktion Elastin-basierter Sequenzen .....	116
4.1.3	Up-Scaling und Abbau der DP1-Proteine.....	118
4.2	Post-translationale Modifikation von Tyrosinen.....	123
4.2.1	<i>In vitro</i> Modifikation mittels Tyrosinasen .....	123
4.2.2	<i>In vivo</i> Modifikation .....	127
4.2.3	Co-Expression von Tyrosinasen und Mfp-Sequenzen .....	128
4.3	Materialwissenschaftliche Untersuchungen .....	131
4.3.1	Thermodynamische Untersuchungen zur temperaturabhängigen Strukturänderung der Designer-Proteine .....	131
4.3.2	Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten der Designer-Proteine an SiO <sub>2</sub> - Oberflächen mittels QCM-D.....	134
4.3.2.1	Festlegung der Versuchsparameter .....	134
4.3.2.2	Vergleichende Untersuchungen zur Proteinadsorption.....	137
4.3.3	Untersuchungen zu den Klebeeigenschaften der Designer-Proteine .....	140
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>145</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>167</b>
8.1	Massenspektrometrische Analysen .....	167
8.1.1	Analysen durchgeführt in der Core Facility – Proteomic Mass Spectrometry (MLU Halle) .....	167
8.1.2	Analysen durchgeführt am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI-MWT Halle (Saale).....	168
8.1.2.1	Methode zur Bestimmung der Hydroxylierungen mittels Massenspektrometrischer Analyse.....	168
8.1.2.2	Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen durchgeführt am Fraunhofer IZI-MWT Halle (Saale) .....	171
8.1.3	Analysen durchgeführt von Frau Dr. Schierhorn (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle) .....	173
8.2	Ergänzende Ergebnisse .....	175
8.3	Protein-Blöcke für das Protein-Design .....	195
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>198</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>201</b>
<b>11</b>	<b>Erweiterter Anhang.....</b>	<b>204</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>218</b>

# 1 Einleitung

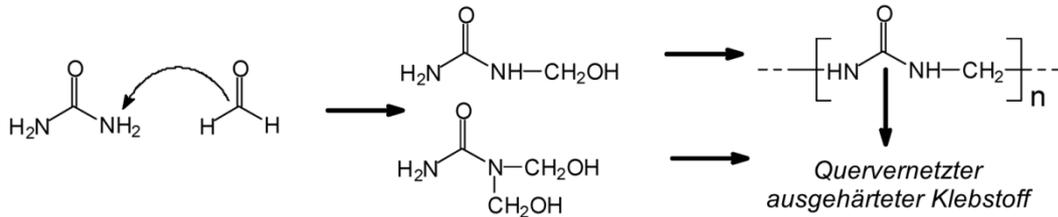
Seit Tausenden von Jahren versuchen Menschen unterschiedlichste Materialien für den Hausbau, die Herstellung von Werkzeugen und Maschinen oder für dekorative Zwecke zu verkleben. Dementsprechend wurden verschiedene Klebetechniken im Laufe der Geschichte entwickelt, die mit Hilfe von Klebstoffen oder Leimen unterschiedliche Substrate verbinden können. Von Beginn an haben sich Menschen von der Natur inspirieren lassen. Insekten, Spinnentiere und Vögel sind in der Lage, Verbundstoffe aus natürlichen Fasern und eigenen Sekreten zu bilden. Viele marine Organismen können sich stabil an Felsen oder andere Oberflächen heften [Favi et al., 2014].

Der erste Meilenstein in der Entwicklung von Klebern war ca. 70000 v. Chr., als Höhlenmenschen in Südafrika eine klebrige Masse aus Baumharz und rotem Ocker benutzten, um ihre Höhlenmalereien zu schützen [Keimel, 2003]. Um 8000 v. Chr. verwendeten Menschen das Harz von Birkenbäumen, um die Köpfe von Speeren und Äxten mit dem sogenannten Birken-teer zu befestigen. Um 3500 v. Chr. führten die Ägypter erstmals die Extraktion tierischer Proteine (Aufkochen von Haut oder Knochen) zur Verwendung als flüssigen Klebstoff ein. Mitte des 14. Jahrhunderts nutzten die Azteken die Haft Eigenschaften von Blut für ihre Bauten und mischten Tierblut in Zement. Für die besonderen Klebeeigenschaften ist das Albumin im Blut verantwortlich. Die Bauwerke der Azteken sind noch heute in einem ausgezeichneten Zustand und zeugen von der Qualität und Beständigkeit dieses Bindemittels.

Im Zuge der Technologisierung suchten Forscher nach Alternativen und insbesondere synthetischen Bindemitteln. Mit der chemischen Modifikation natürlicher Materialien gelang Charles Goodyear 1839 ein technologischer Durchbruch auf diesem Gebiet. Durch die Zugabe von Schwefel konnten Naturkautschuk oder andere verwandte Polymere in haltbare Materialien umgewandelt werden. Anfang des 20. Jahrhunderts experimentierte Baekeland mit Phenol und Formaldehyd [Baekeland, 1909]. Er entdeckte, dass diese Stoffe in einer exothermen Reaktion zu einem Kunstharz polymerisierten. Dieser wurde ab 1910 als erster vollsynthetischer Kleber mit dem Namen „Bakelit“ industriell hergestellt. Während des zweiten Weltkrieges zeigte der Chemiker Dr. Harry Coover, dass die Substanz Cyanoacrylat durch die anionische Polymerisation von monomeren 2-Cyanoacrylsäureestern eine starke Klebekraft entwickelt [Coover und Shearer, 1957; Falbe, 1997]. Dies war der Grundstein für die Entwicklung des Sekundenklebers, welcher schnell an eine Vielzahl von Materialien bindet.

Die exklusive Verwendung von synthetischen Bindemitteln insbesondere in der Werkstoffindustrie, die sich über das vergangene Jahrhundert etabliert hat, kann jedoch zukünftig zu Problemen führen. Dazu zählen die perspektivisch limitierte Verfügbarkeit von fossilen Brennstoffen (Öl, Erdgas, Kohle), Umweltprobleme bei der Entsorgung von synthetisch gebundenen Materialien wie Holz oder Sand, ein erhöhter CO<sub>2</sub>-Ausstoß [Krug und Tobisch, 2010; Weber und Krug, 2005] sowie die gesundheitliche Belastung durch Formaldehyd [National-Toxicology-Programm, 2011]. Folglich steigt die Nachfrage nach Formaldehyd-armen bzw. weitgehend Formaldehyd-freien Bindemitteln. Bislang waren Harnstoff-Formaldehyd-Verbindungen wie Urea-Formaldehyd (UF), melaminverstärktes UF (MUF), Phenol-Formaldehyd (PF) oder Melamin-Urea-Phenol-Formaldehyd (MUPF), Hauptbindemittel für Holzverbundplatten wie Spanplatten oder Faserplatten [Christjanson et al., 2006; Kloeser et al., 2007]. Ihre guten Klebeeigenschaften, die hohe Aushärtungsrate und die geringen Herstellungskosten gehören zu den attraktiven Eigenschaften. Dennoch besitzen die Formaldehyd-Verbindungen eine relativ geringe Wasserbeständigkeit und die Emission von Formaldehyd aus Spanplatten durch die geringe Stabilität der Aminomethylenbindung zählen zu den Nachteilen. In Abb. 1-1

ist beispielhaft eine Reaktion zur Produktion von UF-Verbindungen gezeigt. Zunächst erfolgt eine Additionsreaktion und es kommt zur Ausbildung von Methylolharnstoffen. Anschließend verbinden sich die Monomere in einer Kondensationsreaktion zu größeren Polymeren und es entsteht während der Aushärtung bei ca. 100 – 140 °C das typische UF-Harz [Pizzi und Mittal, 2003].



**Abb. 1-1 Reaktion von Harnstoff mit Formaldehyd zur Herstellung von UF-Harz [Pizzi et al., 2020]**

Seit der Neuklassifizierung von Formaldehyd als krebserregende Substanz durch die WHO im Jahr 2004 ist es ein wichtiges Ziel, die Verwendung und Exposition zu verhindern [Carvalho et al., 2012]. Die zugelassenen Emissionswerte sinken seit 1978 aufgrund internationaler Richtlinien stetig [Marutzky, 2008]. Sowohl die EU als auch das deutsche Umweltbundesamt haben einen Richtwert von 0,1 mL/m<sup>3</sup> (ppm) in der DIN EN 16516 und EN 717-1 festgelegt [DIN, 2017]. Zudem gelten seit Januar 2020 in Deutschland die strengen Emissionsrichtlinien nach E05 für Holzwerkstoffe im Innenbereich, die einen Grenzwert von 0,05 ppm nicht überschreiten dürfen. Im März 2021 hat die ECHA (*European Chemical Agency*) das „*Final Background Document*“ zu möglichen Grenzwerten für Formaldehyd und Formaldehyd emittierende Materialien auf ihrer Website veröffentlicht [ECHA, 2020]. Der Ausschuss für Risikobewertung (RAC) plädiert für eine europaweite Verschärfung des Formaldehydgrenzwertes auf 0,04 ppm. Diese Verschärfung würde ein Niveau erreichen, das für eine Vielzahl von Leimen auf Basis von Harnstoff-Formaldehyd nicht mehr sicher erreicht werden kann.

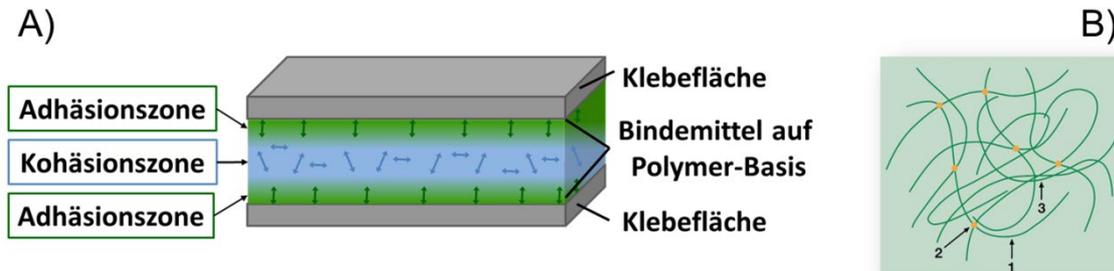
Die Problematik besteht jedoch nicht nur in der Emission nach Fertigstellung, sondern insbesondere bei der Fertigung von Verbundprodukten. Hier sind die Arbeiter/-innen in den Betrieben hohen Formaldehydbelastungen ausgesetzt. Aufgrund der Reglementierung der Emissionswerte und im Sinne des Umweltschutzes und der Nachhaltigkeit besteht ein dringender Bedarf an der Entwicklung Formaldehyd-freier Bindemittel aus erneuerbaren Materialien. Als bio-basierte Alternative werden Proteine für diesen Ansatz bereits seit langem untersucht [Krug und Tobisch, 2010; Substitutionspotenziale, 2010; van Hest und Tirrell, 2001]. Die Vorteile der Proteine liegen in ihrer umweltfreundlichen Abbaubarkeit und Atoxizität, in ihrer geringen immunogenen Wirkung, ihrer funktionellen Vielfalt sowie in ihrer starken spezifischen Adhäsion.

Zusätzlich bieten Proteine im Bereich der Automobilindustrie für Gießereisand einen enormen Vorteil gegenüber gängigen Bindemitteln. Die Protein-verklebten Sandkörner können beispielsweise durch einen enzymatischen Verdau nahezu vollständig und umweltschonend recycelt werden. Die Wiederverwendung des Grundwerkstoffes Sand und die Abtrennung des Bindemittels ist für Gießereisand üblich [Harris und Lafarge, 2006]. Bisher werden auch in diesem Bereich hauptsächlich PF- und UF-Harze verwendet, die je nach Herkunft Rückstände anorganischer Bindemittel und/oder unterschiedliche organische Bindemittel sowie deren pyrolytische Abbauprodukte enthalten. Dies erschwert die Rückgewinnung der Sandkörner. Allein in Deutschland fallen in der Gießereiindustrie etwa 460000 t Gießereirestsand pro Jahr an, der in der Regel durch den Produktionsprozess mit Schwermetallen, Säuren und Glanzkohlenstoffbildnern belastet ist [Knappe et al., 2012]. Dieser Sand wird nach der

Abfallverzeichnis-Verordnung als Abfall eingestuft und muss entsprechend entsorgt werden [BMUB, 2017; §3 Abs. 23]. Sand ist jedoch kein nachwachsender Rohstoff und ist nach Wasser die zweitwichtigste Ressource unserer modernen Gesellschaft. Die einfachere Rückgewinnung von Sandkörnern aus dem Gießereisand durch den Einsatz von Proteinen als Bindemittel ist aus diesem Grund perspektivisch von großen Interesse.

Neben den vorgestellten Vorteilen Protein-basierter Bindemittel gibt es jedoch auch Nachteile bei der Verwendung natürlicher Proteine. Dazu gehören ihre Quell- und Geruchseigenschaften in der materialwissenschaftlichen Produktion. Mit Hilfe biotechnologischer Methoden zum Re-Design oder dem Einbau spezifischer Modifikationen können diese Nachteile natürlicher Proteine für die Verwendung als neuartige Biomaterialien und zur Erzielung bester Bindungseigenschaften vermieden werden. Dabei bietet das Protein-Design und Protein-*Engineering* im Bereich der Materialwissenschaften viele Möglichkeiten, um Proteine für eine spezifische Anwendung zu verändern und zu optimieren.

Für ein solches Design müssen zudem die Voraussetzungen eines guten Bindemittels erfüllt sein. Nach der DIN-Norm „DIN EN 923“ [Müller, 2015] wird ein Klebstoff als Nichtmetall definiert, dessen Klebkraft durch die Kombination von Adhäsion und Kohäsion bestimmt wird. Aus diesem Grund ist auch für das Design eines Klebers auf Polymerbasis eine Kombination aus kohäsiven und adhäsiven Anteilen essentiell. Adhäsive Protein-Blöcke sind für die Haftung an die spezifische Oberfläche eines Werkstoffs (Adhäsionszone) notwendig, während kohäsive Protein-Blöcke in der sog. Kohäsionszone für eine hohe Festigkeit der Polymerschichten und Stabilität des Bindemittels wichtig sind [Habenicht, 2009; Industrie, 2001]. Diese Eigenschaften bringen Proteine von Natur aus mit und eignen sich daher für das Design eines neuartigen Klebstoffs. Dieser Zusammenhang ist schematisch in Abb. 1-2 dargestellt.



**Abb. 1-2 Allgemeines Prinzip eines guten Klebstoffs modifiziert nach [Industrie, 2001]**

A – Schematische Darstellung eines Querschnitts einer Verklebung, B – Molekulare Kräfte im Bereich der Kohäsionszone: 1 – Chemische Bindungen, intramolekular in einem Polymerstrang, 2 – Chemische Bindungen, Quervernetzung mehrerer Polymere, 3 – Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten.

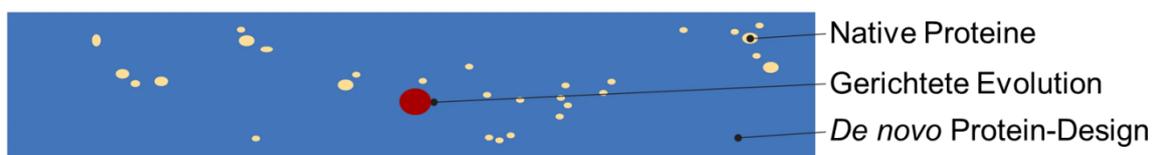
Die Adhäsion wird durch molekulare Wechselwirkungen zwischen der Klebefläche und dem Bindemittel hervorgerufen, die sich in schwächere zwischenmolekulare Wechselwirkungen (Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen) und in starke chemische Bindungen (kovalente, metallische und ionische) einteilen lassen (Abb. 1-2 A). Im Bereich der Kohäsionszone weist ein Klebstoff spezielle Kunststoffeigenschaften auf. Diese werden von molekularen Kräften verursacht, die im Folgenden und in Abb. 1-2 B schematisch dargestellt sind: 1 – Chemische Bindungen, intramolekular in einem Polymerstrang, 2 – Chemische Bindungen, Quervernetzung mehrerer Polymere, 3 – Intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den Polymerketten.

Neben Proteinen sollen an dieser Stelle noch andere Naturstoffe Erwähnung finden. Vielfach findet man in der Natur verschiedenste Klebetechniken, die Organismen für ihre

Überlebensstrategien nutzen. Dabei kommen neben Proteinen, Polysaccharide (Cellulose, Stärke), Polyphenole (Lignin, Urushiol) und Lipide (Terpene, Terpenharze) zum Einsatz. Die Klebkraft dieser natürlichen Klebstoffe liegt im Scherversuch in der Größenordnung von 10 – 14 MPa und ist vergleichbar mit zahlreichen synthetischen Klebstoffen [Onusseit, 2004]. Auch die Verwendung natürlicher Kleber ist vielseitig. Auf Basis pflanzlicher Naturprodukte wird Stärkeleim (gewonnen aus Mais, Kartoffel oder Reis) als Papierkleber verwendet. Aus Holz gewonnene Cellulose wird beispielsweise als Methylcellulose in Tapetenkleister eingesetzt. Ein bereits frühgeschichtlicher Klebstoff ist das Baumharz. Als Bindemittel eignet sich eine verarbeitete Form des Harzes: das Kolophonium [Schälte und Lück, 2020]. Es wird aus Kiefern und Fichten gewonnen und findet vielseitig Verwendung, z. B. als Klebstoff für Heftpflaster, in Kaugummi und zur Behandlung der Bogenhaare bei Streichinstrumenten. Diese kurze allgemeine Vorstellung bio-basierter Klebstoffe verdeutlicht, wie viel Potenzial in der Forschung zu maßgeschneiderten Biopolymeren als Alternative zu chemisch-basierten Bindemitteln liegt.

## 1.1 Protein-Design

Im Laufe der Evolution hat die Natur komplexe Proteine mit einer Vielzahl an spezifischen Eigenschaften geschaffen. Bemerkenswert ist dabei die große Anzahl an Möglichkeiten, die sich aus der Kombination der 20 Aminosäuren ergibt und daraus unterschiedlichste Proteine mit einer definierten Funktion hervorgehen können. Doch während des natürlichen Evolutionsprozesses wurde aus dem gesamten Sequenzraum ( $20^n$ , wobei  $n$  = Länge der Polypeptidkette) nur eine sehr kleine Teilmenge verwendet, die für die notwendigen Funktionalitäten des Lebens ausreicht [Huang et al., 2016]. Dieser Zusammenhang ist in Abb. 1-3 für  $n = 100$  schematisch dargestellt. Die nativen Proteine (beige) lassen sich in Proteinfamilien einteilen, die sich im Laufe der Evolution entwickelt haben [Vendruscolo und Dobson, 2005]. Viele Wissenschaftler haben sich in den letzten Jahrzehnten mit der Klassifizierung nativer Proteine befasst [Hicks et al., 2014]. Beispielsweise wurde 1997 die Pfam-Datenbank (*Protein Families*) aufgebaut, die eine maschinelle Kategorisierung von Proteindomänen vornimmt und dabei alle bekannten Proteine mit einbezieht [El-Gebali et al., 2019; Sonnhammer et al., 1997].



**Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Proteinsequenzraums modifiziert nach [Huang et al., 2016]**

Die Evolution hat nur einen winzigen Bruchteil des gesamten möglichen Sequenzraumes genutzt (blau), dabei haben sich die Proteine zu eng gebündelten Familien nativer Proteine (beige) gruppiert. Die gerichtete Evolution ist auf eine Region des Sequenzraumes beschränkt, die die nativen Proteine umgibt (rot), während das *de novo* Protein-Design den gesamten Sequenzraum erforschen kann. Sequenzraum beispielhaft für  $n = 100$ .

Die erweiterte Nutzung und Erforschung des gesamten Sequenzraumes, der nicht von der Gruppe der nativen Proteine abgedeckt wird, ist in den letzten Jahrzehnten in den Fokus der Forschung gerückt. Das Design artifizierender Proteine kann zu Proteinen mit erweiterten oder völlig neuen Funktionen führen, sowie unser Verständnis der Proteinbiochemie verbessern. Für ein solches Design gibt es im Allgemeinen zwei Möglichkeiten: die gerichtete Evolution und das *de novo* Design. Für den Ansatz der gerichteten Evolution wird als Grundlage ein

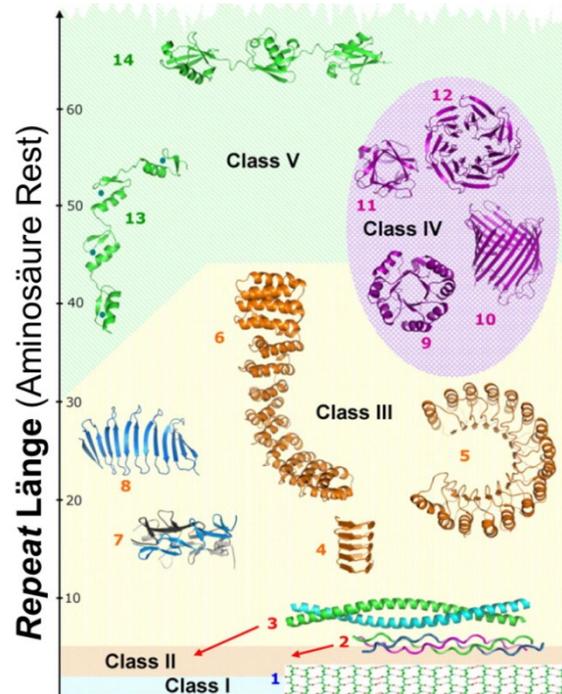
bestehendes Proteinmolekül verwendet, welches bereits eine definierte Struktur und eine bestimmte Funktionalität hat (z.B. Protein-Protein-Interaktion, enzymatische Aktivität, Stabilität) [Jäckel et al., 2008]. Mit dieser Strategie können Proteine durch minimale Veränderungen (z.B. randomisierte Mutagenese) neue Funktionen erlangen ohne ihre Gesamttopologie zu beeinflussen [Dougherty und Arnold, 2009]. Daher ist die gerichtete Evolution auf die Region im Sequenzraum beschränkt, die die nativen Proteine unmittelbar umgibt (Abb. 1-3).

Andererseits gibt es das *de novo* Design von Proteinen, in dem der gesamte Sequenzraum erforscht werden kann. Die Erstellung kombinatorischer Bibliotheken von *de novo* Aminosäuresequenzen bietet dabei eine große Vielfalt an Möglichkeiten zur Entdeckung neuartiger Proteine mit interessanten Eigenschaften. Dennoch ist das *de novo* Design bzw. die funktionelle Vorhersage zur Entwicklung von neuen Proteinen aufgrund der hohen Freiheitsgrade wesentlich komplexer, sowohl auf sequenzieller als auch auf struktureller Ebene, insbesondere die intramolekularen Wechselwirkungen betreffend. Völlig zufällig generierte Sequenzen falten sich häufig nicht zu stabilen proteinähnlichen Strukturen [Hecht et al., 2004; Kohn et al., 2007]. Denn die stabilisierenden Wechselwirkungen, die das Protein in seinen favorisierten Zustand führen, sind oft schwer zu quantifizieren und rechnergestützt vorherzusagen. Zur Optimierung einer Sequenzbibliothek können aber Ansätze des rationalen Designs verwendet werden, um die Qualität der generierten Bibliothek zu verbessern [Kang und Saven, 2007]. Durch Fokussierung auf bestimmte Regionen des Sequenzraumes, die beispielsweise helikale oder  $\beta$ -faltblattartige Strukturen ausbilden, kann dieses Problem gelöst werden. Die Grundidee hinter den derzeitigen Ansätzen für das computergestützte Protein-Design (CPD) besteht darin, strukturelle Eigenschaften (z.B. für die Faltung und Bindung) so weit wie möglich auf der Grundlage physikalischer Prinzipien zu modellieren [Baker, 2019]. Seit den 1990er Jahren versuchen Forscher eine verlässliche Modellierung von Proteinmolekülen auf der Basis eines strukturellen Rückgrat-*templates* zu ermöglichen [Kortemme et al., 1998; Saven, 2002; Zhou et al., 2020]. Vor allem der Forscherkreis um David Baker hat durch die Entwicklung der Rosetta-Plattform (Gemeinschaft von Forschern und Programmierern) auf diesem Gebiet bedeutende Fortschritte erzielt [Kuhlman und Baker, 2000]. Mit der Technologie AlphaFold (DeepMind, London, UK) ist Forschern ein weiterer Meilenstein in der Vorhersage und somit auch der Entwicklung von Proteinstrukturen gelungen, die in der Zukunft sicher die Proteinforschung maßgeblich bestimmen wird [Callaway, 2020; Service, 2020]. Das aktuellste Modell ProtGPT2 wurde von dem Forschungsteam um Prof. Dr. Birte Höcker entwickelt [Ferruz und Höcker, 2022; Ferruz et al., 2022]. Das computerbasiertes Modell ProtGPT2 entwirft eigenständig neue Proteine, die zu stabilen Faltungen fähig sind und definierte Funktionen in größeren molekularen Zusammenhängen übernehmen könnten.

Für das Design funktioneller Biomaterialien steht somit eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Verfügung. In den letzten Jahrzehnten wurde diesbezüglich vor allem im Bereich des *Tissue Engineering* und den Materialwissenschaften an der Entwicklung von Hydrogelen zur Nachahmung der dynamischen Wechselwirkungen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix geforscht [Griffith und Naughton, 2002; Maskarinec und Tirrell, 2005]. Funktionelle Hydrogele können so designt werden, dass sie biokompatibel sind und sich durch Reize wie pH- oder Temperaturveränderung stimulieren lassen [Zeng et al., 2016]. Diese Eigenschaften sind besonders im Bereich der biomedizinischen Anwendungen gefragt.

Als Grundlage für das Design werden häufig *repeat*-Proteine verwendet, die aufeinanderfolgende homologe Struktureinheiten enthalten [Andrade et al., 2001; Main et al., 2005]. Diese sind in der Natur allgegenwärtig und an vielen wesentlichen Prozessen (Protein-Protein-

Interaktionen, Stabilität, Bindungsprozesse) beteiligt. Die natürlichen Strukturproteine reichen von einfachen kristallinen  $\beta$  – Strukturen (z.B. Poly-Ala in Spinnenseiden) über dreifach helikale Strukturen (z.B. Kollagen in Knochen), antiparallele  $\beta$  – Faltblattstrukturen bis hin zu  $\beta$  – Fass Strukturen (z.B. Transmembranproteine) oder einer Kombination aus  $\alpha$ -Helices und antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen (z.B. Zinkfinger-Domäne in Transkriptionsfaktoren) [Kajava, 2012]. Eine kleine Auswahl von Strukturproteinen ist in Abb. 1-4 dargestellt. Die spezifisch elastischen, starren oder zähen Eigenschaften dieser Strukturproteine sind auch für die materialwissenschaftliche Forschung interessant und eignen sich für das Design neuartiger Protein-basierter Materialien. Beim Design können zudem neue Funktionen beispielsweise durch Einfügen, Entfernen oder Austauschen von Struktureinheiten erzielt werden.



**Abb. 1-4** Mögliche Einteilung von *repeat*-Proteinen basierend auf der Länge ihrer Wiederholungen nach [Kajava, 2012]

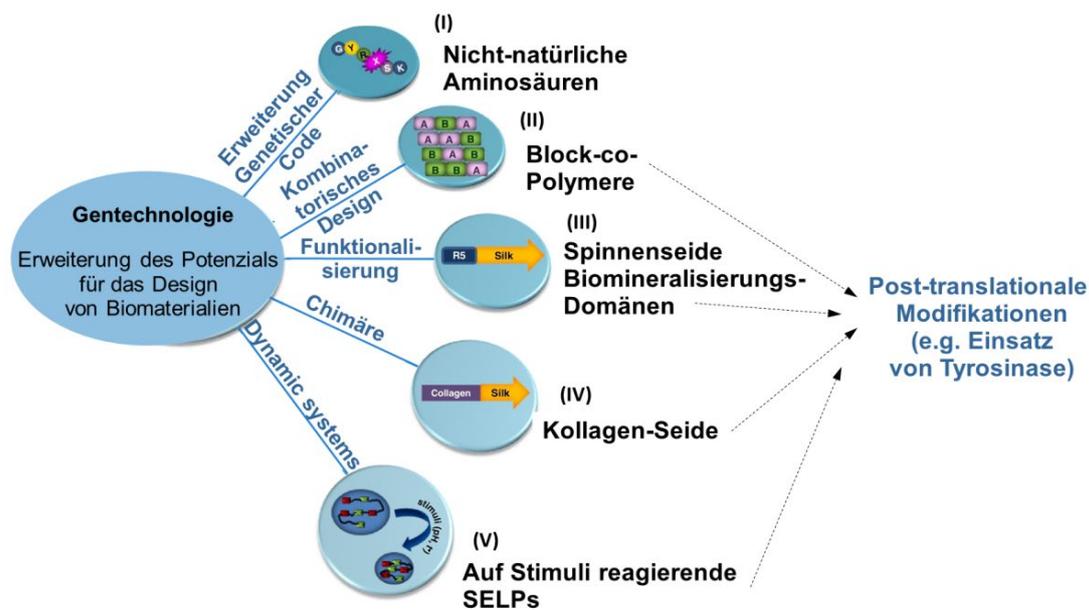
Dargestellt sind Beispiele der *Repeat*-Proteinklassen. Klasse I: 1 – kristalline  $\beta$ -Struktur von Poly-Ala; Klasse II: 2 – Tripelhelix von Kollagen, 3 –  $\alpha$ -helikale *coiled-coil* Struktur; Klasse III: 4 –  $\beta$ -Solenoid-Struktur, 5 –  $\alpha/\beta$ -Solenoid des LRR-Proteins (Leucin-reiches *Repeat*), 6 –  $\alpha$ -Solenoid-Struktur, 7 – Trimer aus  $\beta$ -Spiralen, 8 – antiparallele  $\beta$ -Faltblattstruktur; Klasse IV: 9 – TIM-Fassstruktur (Triosephosphat-Isomerase), 10 – porenbildende  $\beta$ -Fass Struktur, 11 –  $\beta$ -*Trefoil*-Struktur, 12 –  $\beta$ -Propeller Struktur und Klasse V: 13 – Zink-Fingerdomäne, 14 – Poly-Ubiquitin-Kette.

## 1.2 Inspiration aus der Natur

In der Natur angewandte Prinzipien zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen bieten eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung bio-basierter Bindemittel. Neben dem strukturellen Aspekt bietet die Natur zusätzlich eine große Auswahl an Proteinen mit adhäsiven Eigenschaften zur Haftung an bestimmte Oberflächen. Bio-basierte Bindemittel sind in der Lage Hohl- und Zwischenräume zu füllen, unterschiedliche Materialien zu verbinden und starke Verbindungen durch eine hohe Scher- und Zugfestigkeit zu erzeugen [Favi et al., 2014]. Die in Kapitel 1.1 (S. 4) beschriebenen Grundlagen für das Design von Proteinen sollen im Folgenden an ausgewählten Beispielen vorgestellt werden.

Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften wurden in den letzten Jahrzehnten vor allem Faserproteine wie Seide, Elastin und Kollagen untersucht. Doch die Übertragung dieser

natürlichen Strukturkonzepte auf bio-inspirierte Materialien stellt eine Herausforderung für Materialwissenschaftler dar. Vor allem die Wechselwirkungen zwischen Struktur und Funktion, sowie deren Kontrolle während der Proteinfaltung kann von klassischen Polymerisationsverfahren oft nicht gewährleistet werden. Die Verwendung biologischer Systeme zur Produktion von Materialien rückte daher schon zeitig in den Fokus der Forschung [van Hest und Tirrell, 2001]. Durch Protein-*Engineering* können künstliche Materialien auf Proteinbasis erzeugt werden, die neue und verbesserte Eigenschaften haben. Eine Übersicht der Vielfalt an gentechnischen Möglichkeiten ist schematisch in Abb. 1-5 dargestellt.



**Abb. 1-5 Möglichkeiten für das Design von Bio-inspirierten Materialien durch Gentechnik modifiziert nach [Dinjaski und Kaplan, 2016]**

Die dargestellten Strategien umfassen die Aufnahme von nicht-natürlichen Aminosäuren (I), die Auswahl spezifischer Domänen (A,B) und deren kombinatorisches Design (II), die Funktionalisierung von natürlichen Sequenzen (III), rekombinante Chimäre Protein-Designs (IV, z.B. Kollagen-Seide) und die Produktion von dynamischen Systemen (V), die auf äußere Reize wie pH-Wert oder Temperatur reagieren können (z.B. SELPs). Im Anschluss können die Polymere post-translationally modifiziert werden. Beispielsweise kann durch Tyrosinase eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Peptid-gebundene Tyrosine eingefügt werden und es entsteht L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA).

Für das Design neuartiger Biomaterialien können Proteine oder Peptidsequenzen verwendet werden. Dabei kann der genetische Code durch das Einfügen nicht-kanonischer Aminosäuren (AS) erweitert werden (I, Abb. 1-5). Es wurde bereits gezeigt, dass einige Aminoacyl-tRNA-Synthetasen in der Lage sind neben natürlichen Aminosäuren auch nicht-kanonische AS wie z.B. p-Acetylphenylalanin, p-Fluorophenylalanin oder L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) als Substrate zu verwenden und während der Proteinbiosynthese in die Sequenz einzubauen [Fan et al., 2014; Melnikov und Söll, 2019]. Zusätzlich bietet die Kombination von verschiedenen Proteindomänen (II, Abb. 1-5) einen vielversprechenden Ansatz, um rekombinante Materialien auf Proteinbasis mit multiplen Funktionalitäten zu produzieren [Dinjaski und Kaplan, 2016; Lin und Liu, 2016; Matsuura et al., 2004]. Dieser modulare Aufbau im Design wurde bereits vielfach untersucht, z.B. mehrschichtige Strukturen bestehend aus Elastin-ähnlichen Polypeptiden (ELPs) und Peptid-Amphiphilen (PAs) [Inostroza-Brito et al., 2015], Hydrogele aus den Vernetzungsdomänen SpyTag und SpyCatcher mit ELP-Domänen [Sun et al., 2014] oder die Kombination von Seiden-Elastin-ähnlichen Polypeptiden (SELPs) [Wang et al., 2014]. Eine weitere Option für das Design von Biomaterialien ist die Funktionalisierung natürlicher

Proteindomänen (III, Abb. 1-5). Beispielsweise wurde die Domäne des Spinnenseidenproteins mit einem Peptid-Motiv aus dem Protein Silaffin (R5) fusioniert, welches an der Morphogenese der Silica-Zellwände von Diatomeen beteiligt ist. Das Silica-bindende Peptid induziert und reguliert die Fällung von Kieselsäure in chimären Protein-Designs unter ambienten Bedingungen und trägt somit zur Biomineralisation an Oberflächen bei [Huang et al., 2017]. Des Weiteren ist die Entwicklung von Hybridsystemen ein vielversprechender Ansatz im Protein-Design (IV, Abb. 1-5). Die Kombination von Sequenzen verschiedener Faserproteine (Elastin, Kollagen, Seide) führte in den vergangenen Jahren zu neuartigen Eigenschaften oder Funktionen von Biomaterialien [Foo und Kaplan, 2002; Huang et al., 2017; Huang et al., 2015; Wang et al., 2014]. Martens und Kollegen konnten durch die Kombination von Sequenzen aus der Seidenspinner-Seide (SLP's – engl. *Silk-like peptides*) und Kollagen-ähnlichen Peptiden (CLP's – engl. *Collagen-like peptides*) ein neues Biomaterial mit maßgeschneiderten mechanischen Eigenschaften herstellen, welches zugleich biologische Wechselwirkungen für spezifische *in vivo* und *in vitro* Anwendungen sowie eine gezielte Wirkstoffabgabe in Geweben ermöglicht [Martens et al., 2009b]. Eine Erweiterung der Chimären stellt das Einfügen von Sequenzen, die auf äußere Reize oder Veränderungen reagieren dar (V, Abb. 1-5). So können beispielsweise Biomaterialien entstehen, deren mechanische Eigenschaften sich durch Stimuli wie Temperatur, pH-Wert oder Ionenstärke verändern [Wang et al., 2014]. Diese dynamischen Eigenschaften wurden insbesondere für Biopolymere bestehend aus Sequenzen der Seidenspinner-Seide und Elastin-ähnlichen Peptiden (ELP's – engl. *Elastin-like peptides*) untersucht [Collins et al., 2014; Dandu et al., 2009; Machado et al., 2013; Qiu et al., 2010]. Diese sogenannten SELP's (engl. *Silk-Elastin-like peptides*) zeigten gewünschte Eigenschaften in Bezug auf Zugfestigkeit und Adhäsion. Des Weiteren haben Winkler und Kollegen eine sich wiederholende Konsensus-Sequenz aus der Tragfadenseide von Spinnen mit einem Redox-Schalter und einer flankierenden Poly-Ala-Sequenz erweitert, sodass die Ausbildung der  $\beta$ -Faltblätter vom Redoxzustand abhängig ist. Das artifizielle Protein wurde in *E. coli* produziert und erlaubte Einblicke in Selbstorganisation von Faserproteinen [Winkler et al., 1999].

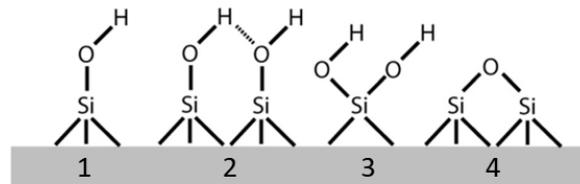
Neben den vielen neuen Möglichkeiten, die das Protein-Design artifizieller Biomaterialien ermöglicht, gibt es eine große Herausforderung für deren Produktion in heterologen Organismen. Die natürlichen tierischen Faserproteine wie Elastin, Kollagen, Resillin und Spinnenseiden enthalten eine hohe Anzahl an sich wiederholenden Sequenzblöcken und sind in der rekombinanten Synthese vor allem in prokaryotischen Produktionsorganismen durch die Limitierung des natürlichen t-RNA-Pools eingeschränkt. Beispielsweise liegt allein der Anteil an Gly im nativen Spinnenseidenprotein bei 44,9 %. Ein möglicher Lösungsvorschlag wurde in einer Arbeit von Xia und Kollegen untersucht [Xia et al., 2010]. Dafür wurde ein *E. coli* Stamm verwendet, dessen tRNA-Pool für Gly durch *metabolic Engineering* erhöht wurde. Dadurch konnten rekombinante Spinnenseidenproteine nativer Größe von 54,6 – 284,9 kDa erfolgreich produziert und zu einer Faser gesponnen werden, deren mechanische Eigenschaften mit denen der nativen Seide vergleichbar waren. Des Weiteren wurde der Einfluss von zusätzlichen Aminosäuren (AS) im Kultivierungsmedium während der Produktion repetitiver ELP-Proteine untersucht [Chow et al., 2006]. Vor allem durch die Zugabe von Pro und Ala, die einen hohen Anteil in ELP-Sequenzen ausmachen, konnte die Ausbeute eines ELP-GFP (engl. *Green fluorescent protein*) Fusionsproteins um das 6-fache auf einen Wert von 1,6 g/L in Schüttelkolbenkulturen gesteigert werden. Darüber hinaus zeigte auch die Zugabe anderer AS zum Kultivierungsmedium, die nicht in ELP vorkommen, z. B. Asn, Asp, Gln und Glu, einen positiven Effekt auf die Proteinausbeute. Dadurch wurde gezeigt, dass eine Optimierung der

Kultivierungsbedingungen für die rekombinante Produktion repetitiver Sequenzen vorteilhaft sein kann.

## 1.3 Funktionsbasiertes Design der Proteine für materialwissenschaftliche Anwendungen

### 1.3.1 Grundidee

Aus den vorherigen Kapiteln geht hervor, dass für das Design bio-inspirierter Materialien eine Vielzahl an Möglichkeiten zur Verfügung steht. Das Protein-Design, sowie die zu Grunde liegende Proteinsequenz sollte je nach Anwendungsgebiet ausgewählt werden, um spezifische Eigenschaften für eine bestimmte Applikation zu gewährleisten. Anwendungen natürlich inspirierter Biomaterialien reichen von Hydrogelen, *Tissue Engineering* für medizinische Anwendungen, Nanofibrillen bis hin zu Klebstoffen. Basierend auf dem allgemeinen Prinzip eines guten Klebstoffs ist für das Design eine Kombination aus kohäsiven und adhäsiven Protein-Blöcken notwendig (Kap. 1, Abb. 1-2, S. 3). Die Zielproteine der vorliegenden Arbeit sollten zudem keinen oder nur einen sehr geringen Anteil an schwefelhaltigen Aminosäuren (AS) enthalten. Dadurch sollte eine mögliche Geruchsbildung bei Erwärmung der Proteine verhindert werden. Aus diesem Grund wurden gezielt Proteinsequenzen für das Design verwendet, die im Zielprotein (nach Aufarbeitung und Abspaltung von Protein-tags zur Reinigung) kein Cystein und Methionin enthalten.



**Abb. 1-6 Oberflächenchemie von Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ), modifiziert nach [Coyle und Baneyx, 2014]**

Silanolgruppen auf der Oberfläche von  $\text{SiO}_2$ . 1 – Freies Silanol, 2 – Wasserstoff-gebundenes / vicinales Silanol, 3 – Geminales Silanol und 4 – Siloxan.

Für das Protein-Design wurde ebenfalls das Zielmaterial für eine mögliche Nutzung als Bindemittel betrachtet. In der vorgelegten Arbeit sollte ein Proteinkleber für den Rohstoff Sand untersucht werden. Sand wird im Bereich der Automobilindustrie für Gießereisand eingesetzt (Kap. 1, S. 1) und besitzt eine hydrophile Oberfläche, welche vorwiegend aus Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ ) besteht. Die Oberflächenchemie von  $\text{SiO}_2$  ist in Abb. 1-6 gezeigt und lässt sich in freies Silanol, vicinales Silanol, geminales Silanol und Siloxan einteilen. Silica- oder Mica-Oberflächen (OF) werden bevorzugt in der Klebstoffforschung als experimentelles Substrat eingesetzt, weil Mica atomar „glatt“ und seine Oberflächenchemie gut reproduzierbar ist. Demnach sollten als adhäsive Blöcke Proteinsequenzen ausgewählt werden, die in der Lage sind, an  $\text{SiO}_2$ -OF zu binden. Die Untersuchungen der Klebkraft erfolgten demnach in der vorliegenden Arbeit an Mica-OF. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte wurde ein Baukastensystem bestehend aus verschiedenen Protein-Blöcken (adhäsiv, kohäsiv, Linker, Protein-tags) entwickelt, welches detailliert in Kap. 1.4 (S. 10) vorgestellt wird.

Zusätzlich zur zielgerichteten Auswahl der Protein-Blöcke wurde auch deren Kombinierbarkeit im Hinblick auf die Produktion und Aufarbeitung der Proteine geprüft und bewertet. Neben der klassischen chromatografischen Reinigung, wurden alternative Reinigungsstrategien wie das

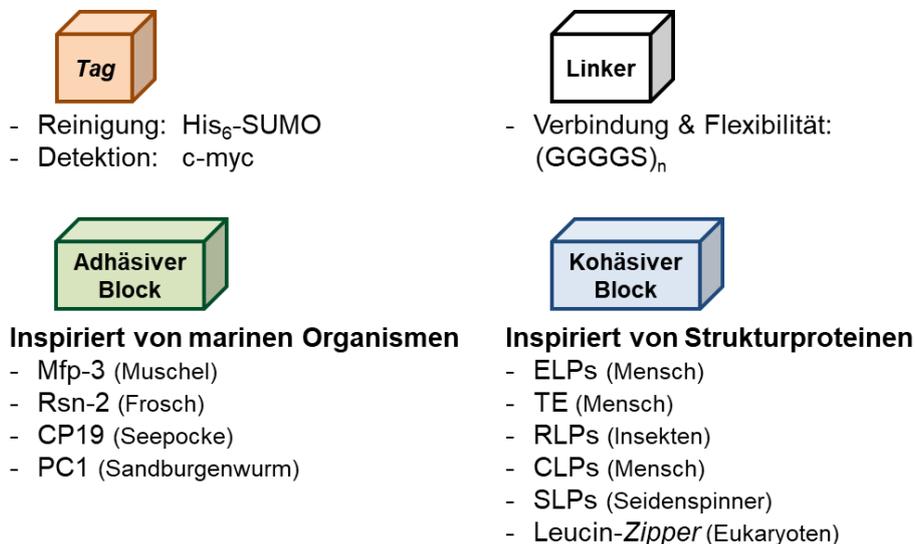
*Inverse transition cyclig* (ITC), fraktionierende Fällung, Acetonextraktion und Hitzefällung in Betracht gezogen.

Für das Design der neuartigen Proteine wurden folgende Parameter festgelegt:

- (I) Design nach dem Prinzip eines guten Klebstoffs auf Polymerbasis aus einer Kombination aus kohäsiven und adhäsiven Anteilen nach DIN-Norm „DIN EN 923“ [Müller, 2015]
- (II) Vermeidung schwefelhaltiger Aminosäuren
- (III) Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ , Hauptbestandteil von Sand) als Zieloberfläche für den Proteinkleber
- (IV) Informationen zu heterologer Produktion der Proteinsequenz (Primärliteratur)

## 1.4 Protein-Blöcke in Biomaterialien

In der Literatur werden für das Design von Biomaterialien verschiedene Protein-Blöcke verwendet. Eine Auswahl wird nach ihrer Funktionalität im Folgenden vorgestellt.



**Abb. 1-7 Übersicht zu bekannten Protein-Blöcken aus der Literatur**

Das Baukastensystem besteht aus vier Hauptelementen: *tag*-Sequenzen (orange), Linker-Sequenzen (weiß), adhäsive Blöcke (grün) und kohäsive Blöcke (blau). Die *tag*-Sequenzen lassen sich nach ihrer Funktion einteilen: Reinigung (His<sub>6</sub>-*tag*), Funktion (Car9 = Dodecapeptid DSARGFKKPGKR) und Detektion (c-myc-*tag*). Als Linker-Sequenz wurde ein flexibler Gly-Ser-Linker (GGGGS)<sub>n</sub> verwendet. Für die Auswahl der adhäsiven Blöcke wurden Proteinsequenzen mariner Organismen betrachtet: Mfp-3 – Muschelfußproteine-3 der Gattung *Mytilus*, Rsn-2 – Ranaspumin 2 aus *E. pustulosus*, CP19 – Zement-Protein 19 aus *F. albicostatus*, PC1 – Polychaeten-Zementpeptide aus *P. californica* und Nectin aus *P. lividus*. Die Auswahl der kohäsiven Blöcke wurde von natürlichen Strukturproteinen inspiriert: ELP – Elastin-ähnliche Polypeptide aus *H. sapiens*, TE – Tropoelastin aus *H. sapiens*, RLP – Resilin-ähnliche Polypeptide aus *D. melanogaster*, CLP – Kollagen-ähnliche Polypeptide aus, SLP – Seiden-ähnliche Polypeptide aus *B. mori* und die Leucin-*Zipper*-Sequenz aus Eukaryoten.

Die Protein-Blöcke lassen sich in ein Baukastensystem einordnen, welches aus adhäsiven und kohäsiven Blöcken, sowie *tag*- und Linker-Sequenzen besteht. Für den Einsatz als Bindemittel sind folgende sechs Kriterien an die Proteinsequenzen wichtig: Dazu gehören die in der Literatur beschriebene rekombinante Produktion, Fusionen (relevant im Hinblick auf die Materialeigenschaften oder für die Proteinaufarbeitung), Material- und/oder Bindeeigenschaften, sowie die Komplexität, der Neuheitswert als auch die Risikobewertung. Eine Übersicht interessanter Protein-Blöcke aus der Natur sind in Abb. 1-7 dargestellt. Detaillierte Informationen der Protein-Sequenzen sind tabellarisch im Anhang hinterlegt (Kap. 8.3, Tabelle 8-11, S. 195).

### 1.4.1 Adhäsive Protein-Blöcke

In der Literatur ist eine Vielzahl von Proteinsequenzen mit adhäsiven Eigenschaften beschrieben. Eine Übersicht ausgewählter Proteine befindet sich in Tabelle 1-1 (S. 11): Zement Protein 19 (CP19) aus der Seepocke (i), Ranaspumin-2 (Rsn-2) aus dem Frosch (ii), Polychaet-Zementpeptide (PC1) aus dem Sandburgenwurm (iii) und Muschelfußproteine (Mfp) aus Muscheln (iv).

**Tabelle 1-1 Übersicht adhäsiver Proteine mariner Organismen**

Protein	Herkunft	Art	MW (kDa)	Heterologe Produktion	Literatur
(i) CP19	Seepocke	<i>Fistulobalanus albicostatus</i>	17,3	<i>E. coli</i>	[Kamino, 2013; Liang et al., 2015; Urushida et al., 2007]
(ii) Rsn-2	Frosch	<i>Engystomops pustulosus</i>	11,1	<i>E. coli</i>	[Cooper und Kennedy, 2010; Cooper et al., 2017]
(iii) PC1	Sandburgenwurm	<i>Phragmatopoma californica</i>	14,6	Nein	[Stewart, 2011; Zhao et al., 2005].
(iv) Mfp	Muschel				
Mefp-3		<i>Mytilus edulis</i>	5,83	Nein	[Waite und Tanzer, 1981]
Mgfp-3		<i>Mytilus galloprovincialis</i>	5,59	<i>E. coli</i>	[Hwang et al., 2005]

Mfp – Muschelfußproteine, CP19 – Zement-Protein 19, Rsn-2 – Ranaspumin 2, PC1 – Polychaeten-Zementpeptid.

- (i) CP19 wird in der Literatur als vielversprechender Kleber beschrieben. Durch elektrostatische Wechselwirkungen in der Polypeptidkette wird eine Aggregation vermittelt, die zu einer hohen Zugfestigkeit führt [Kamino, 2013; Urushida et al., 2007].
- (ii) Das Froschschaum-Protein Rsn-2 weist ebenfalls adhäsive Eigenschaften auf und besitzt eine helikale  $\beta$ -Faltblattstruktur, die an einer Luft-Wasser-Grenzfläche eine offene Konformation einnimmt [Cooper und Kennedy, 2010; Cooper et al., 2017]. Diese Eigenschaft von Tensidproteinen eignet sich für den Einsatz in Klebstoffen zur Reduzierung der Oberflächenspannung für eine verbesserte Substratbenetzung sowie zur Vermeidung von Problemen bei der Beschichtung von schwierigen Oberflächen (nass, glatt oder unstrukturiert) [Iturri et al., 2015].
- (iii) Die hauptsächlich unstrukturierten PC1-Peptide (*random-coil*) aus Polychaeten bestehen hauptsächlich aus Gly, Lys und Tyr. Ungefähr 2/3 der Tyrosine sind zu DOPA modifiziert [Endrizzi und Stewart, 2009]. Die Peptide bilden durch saure und basische Seitenketten innerhalb der Peptidsequenz unter dem Einfluss von  $Mg^{2+}$ - und  $Ca^{2+}$ -Ionen Koazervate [Stewart, 2011; Zhao et al., 2005]. Dieser Prozess ist pH-abhängig. Die Klebstoff-bildenden Koazervate weisen eine hohe Haftfestigkeit auf, die 40 % der von Cyanacrylat-Klebstoffen entspricht [Shao et al., 2009].
- (iv) Muschelfußproteine (Mfp) erlauben der Muschel unter sehr rauen Umweltbedingungen an diversen Oberflächen im Meer zu haften [Martinez Rodriguez et al., 2015]. Die Mfp zeichnen sich durch das Vorhandensein der post-translationalen Modifikation (PTM) von Tyr zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) in der Peptidkette aus [Waite und Tanzer, 1981]. DOPA wird in der Literatur als Schlüsselmolekül für die Klebeeigenschaften mariner Organismen beschrieben [Deming, 1999; Lee et al., 2006]. Aus diesem Grund eignen sich Mfp und Mfp-basierte Sequenzen für den Einsatz als bio-

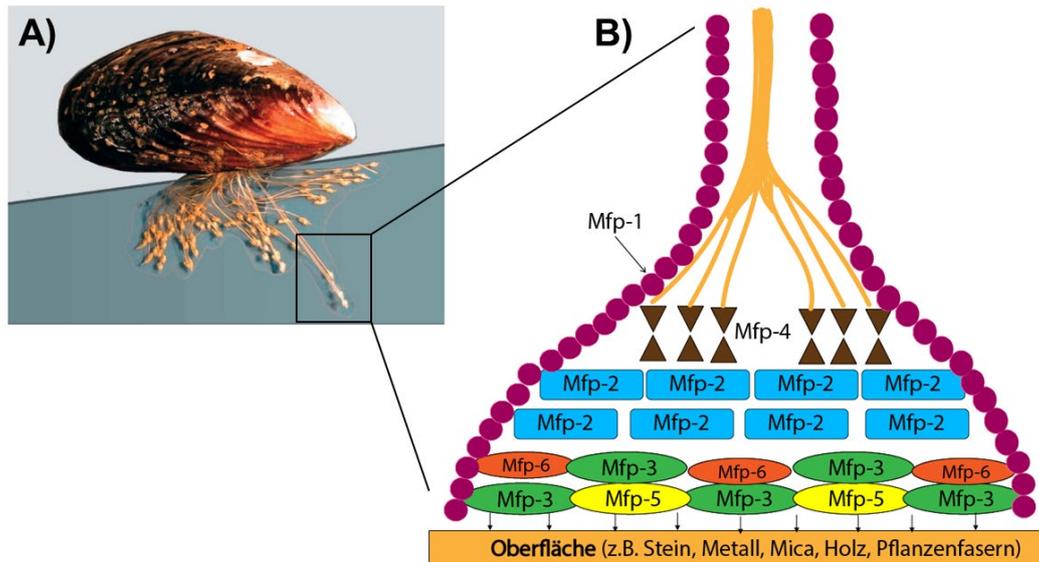
basierte Klebstoffe sowie berichteter adhäsiver Klebeeigenschaften [Hwang et al., 2013; Kim et al., 2018].

Aus einer umfangreichen Literaturrecherche zu adhäsiven Protein-Blöcken wurden Mfp als zentraler Block für das Protein-Design der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Grund war zum einen das Vorhandensein von DOPA und der Vielfalt an Adhäsionsmöglichkeiten an verschiedene Materialien [Gebbie et al., 2017; Kord Forooshani und Lee, 2017; Rev.; Waite, 2017], auch an hydrophilen Oberflächen wie SiO<sub>2</sub> [Li und Zeng, 2016; Mian et al., 2014]. Darüber hinaus war in der Literatur bereits die rekombinante Produktion ausgewählter Mfp in *E. coli* beschrieben [Hwang et al., 2005; Yang et al., 2013]. Auch für rekombinante Mfp wurden die charakteristischen adhäsiven Eigenschaften nachgewiesen und sind bisher für biomedizinische Anwendungen als Wundkleber beschrieben [Hwang et al., 2013; Kim et al., 2018]. Da Mfp-basierte Proteine die Grundlage für das Design der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Designer-Proteine bildeten, werden Mfp in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

#### 1.4.1.1 Muschelfußproteine

Muscheln können unter sehr rauen Umweltbedingungen innerhalb von 30 s bis 8 min abhängig vom Alter, wobei Jungmuscheln am schnellsten sind, an festen Oberflächen im Meer haften [Martinez Rodriguez et al., 2015]. Die Ursache für diese einzigartigen Hafteigenschaften ist ein heterogenes Proteingemisch, das verschiedene Muschelfußproteine (Mfp) enthält. Dieser komplexe Proteincocktail wird im inneren Gewebe der Muschel synthetisiert und ausgeschieden, um den so genannten Adhäsionsbyssus zu bilden. Einer der führenden Wissenschaftler auf diesem Forschungsgebiet, Herbert Waite, war einer der ersten, der den Muschelbyssus systematisch analysiert und die zugrunde liegende Biochemie beschrieben hat [Waite, 1983a; Waite und Andersen, 1978b; Waite und Andersen, 1980]. Waite und seine Kollegen entdeckten in der Polypeptidkette von Mfp eine häufig auftretende post-translationale Modifikation (PTM) von Tyr zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA). In der Folge wurde DOPA als Schlüsselmolekül der Adhäsion an verschiedenen Oberflächensubstraten identifiziert [Waite, 1983b; Waite und Tanzer, 1981]. Diese PTM in den Mfp lässt auf die Existenz einer 3-Tyrosyl-Hydroxylase oder Tyrosinase schließen, die jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht genau identifiziert und charakterisiert wurde. In transkriptomischen Analysen der Muschel *Perna viridis* konnten zwei Tyrosinase-ähnliche Sequenzen gefunden werden. Jedoch konnten noch keine Hydroxylase-Aktivitäten dieser Proteine gezeigt werden [Guerette et al., 2013].

Der bereits erwähnte Adhäsionsbyssus wird aus dem Fuß der Muscheln abgesondert und besteht aus einem Bündel von Muschelfäden (Abb. 1-8 A), die in einer ausgewachsenen Muschel jeweils 2 – 6 cm lang sein können. Ein Muschelfaden enthält drei Teile: einen adhäsiven Plaque, einen steifen distalen Teil und einen proximalen Teil [Silverman und Roberto, 2007; van Hest und Tirrell, 2001]. Die Byssusfäden und die Plaques bestehen aus 25 – 30 verschiedenen Proteinen. Fünf davon sind ausschließlich Plaque-Proteine, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt wurden (Mfp-2 bis Mfp-6). Eine Ausnahme bildet Mfp-1, welches das Schlüsselprotein in der Kutikula des Adhäsionsbyssus bildet. Des Weiteren enthalten die Muschelfäden Kollagen-ähnliche Proteine (preCOLs) sowie Fadenmatrixproteine (TMP-1). Die biochemischen Eigenschaften der jeweiligen Proteine bestimmen ihre spezifische Lokalisation und deren funktionelle Rolle für die Muschel [Lee et al., 2011; Silverman und Roberto, 2010; Waite, 2017]. In Tabelle 1-2 (S. 13) sind die Eigenschaften der Proteine im Adhäsionsbyssus der am besten erforschten Muschelgattung *Mytilus* zusammengefasst.



**Abb. 1-8 Schematische Übersicht zur Adhäsion der Muschel an eine Oberfläche, modifiziert nach [Lee et al., 2011; Rev.; Waite, 2017]**

A) Ausgewachsene Muschel (5 cm Länge), deren Byssus an einer Mica-Oberfläche befestigt ist. Jeder Byssus besteht aus einem Bündel von Fäden (*threads*), die am Ende mit klebrigen Plaques ausgestattet sind. B) Schematische Darstellung der Verteilung der Muschelfußproteine 1 – 6 (Mfp-1 – violett, Mfp-2 – blau, Mfp-3 – grün, Mfp-5 – gelb, Mfp-6 – rot) im Muschelfuß (*foot*). Mfp-3 und Mfp-5 sind dabei an der Adhäsion an eine Oberfläche beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für das Design der Proteine aus den bekannten Mfp im Adhäsionsbyssus Mfp-3 als adhäsiver Block ausgewählt. Wie in Abb. 1-8 B gezeigt, ist Mfp-3 neben Mfp-5 maßgeblich am Adhäsionsprozess von Muscheln an eine Zieloberfläche beteiligt. Mfp-5 enthält als post-translationale Modifikation, neben DOPA, Phosphoserin (pSer). Die Bildung sowie die Rolle von pSer in Mfp-5 in der Adhäsion ist bislang nicht vollständig geklärt [Kord Forooshani und Lee, 2017]. Im Allgemeinen ist pSer für seine Fähigkeit bekannt, an kalkhaltige Mineralien zu binden (z.B. Statherin). Es wird vermutet, dass die Phosphoserine Kalzium oder eine kalkhaltige Mineraloberfläche binden und folglich eine wichtige Rolle in der Adhäsion von Mfp-5 einnehmen [Waite und Qin, 2001]. Um die Komplexität unterschiedlicher PTMs (Hydroxylierung und Phosphorylierung in Mfp-5) in den Designer-Proteinen zu vermeiden, die einen Einfluss auf die Bindung zeigen können, wurde Mfp-3 für das Design in der vorliegenden Arbeit ausgewählt. Darüber hinaus wurde die Bindung von Mfp-3 bereits an einer Vielzahl von Oberflächen in der Literatur gezeigt [Even et al., 2008; Höök et al., 2001; Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2004; Kim et al., 2018; Mian et al., 2014]. Die vielversprechenden Eigenschaften von Mfp wurden auch an Mica-Oberflächen [Yu et al., 2011b] und anderen Metalloxid-Oberflächen [Lee et al., 2006] nachgewiesen.

**Tabelle 1-2 Vergleich der bekannten Proteine im Adhäsionsbyssus der Spezies *Mytilus* hinsichtlich der Lokalisierung im Byssus, Molekulargewicht (MW), Struktur, Modifikation und Funktion. (PPII – Polyprolin-II-Helix; EGF – Epidermaler Wachstumsfaktor; DOPA – L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, HyR – Hydroxyarginin; HyP – Hydroxyprolin; pSer – Phosphoserin; Trimer – Masse entspricht dem Trimer; OF – Oberfläche)**

Protein	Lokalisation	MW (kDa)	Struktur	Modifikationen*	Funktion
Mfp-1	Kutikula	~ 110	Unstrukturiert; PPII	15 mol% DOPA, HyP (n.d.)	Äußere Schutzschicht
Mfp-2	Plaque, innen	45	Unstrukturiert, EGF	5 mol% DOPA	Stabilität

Mfp-3	Plaque, OF	6	Unstrukturiert	20 - 25 mol% DOPA, 12 – 24 mol% HyR	Adhäsion an OF
Mfp-4	Plaque, innen	90	Unstrukturiert	2 mol% DOPA	Stabilität
Mfp-5	Plaque, OF	11	Unstrukturiert	30 mol% DOPA, pSer (n.d.)	Adhäsion an OF
Mfp-6	Plaque, OF	12	Unstrukturiert	5 mol% DOPA	Adhäsion an OF
preCOL-D	Faden, innen (distal)	240 (Trimer)	Kollagen <i>core</i> , Seiden-ähnlich	0,1 mol% DOPA, HyP (n.d.)	Steifigkeit
preCOL-P	Faden, innen (proximal)	240 (Trimer)	Kollagen <i>core</i> , Elastin-ähnlich	0,1 mol% DOPA, HyP (n.d.)	Elastizität
TMP-1	Faden, innen	56,5	Unstrukturiert	DOPA	Ausrichtung der Kollagenfibrillen

\* mol% - Stoffmengenanteil, gängige Angabe des DOPA-Anteils in Mfp-basierten Sequenzen jeweils bezogen auf die Gesamtstoffmenge des zu charakterisierenden Proteins; n.d., nicht bestimmt.

#### 1.4.1.1.1 Muschelfußprotein-3 (Mfp-3)

Mfp-3 besteht aus bis zu 20 verschiedenen Sequenzvarianten [Zhao et al., 2006]. Dabei ist der N-Terminus hochkonserviert und die Unterschiede sind in der C-terminalen Region zu finden. Die meisten der Substitutionen und/oder Insertionen in der Polypeptidkette sind Tyr, Gly, Asn oder Arg [Florioli et al., 2000]. Die Forscher zeigten, dass die Expression und Sekretion von spezifischen Mfp-3-Varianten nicht Oberflächen-induziert ist. Die Ursache der verschiedenen Sequenzvarianten ist bislang nicht geklärt. Im Allgemeinen werden die Mfp-3-Varianten nach ihrem Laufverhalten in der Elektrophorese in zwei Gruppen eingeteilt: das schnell migrierende Mfp-3f (*fast*) und das langsam migrierende Mfp-3s (*slow*). Beide Proteintypen sind reich an Gly (25-29 mol%) und Asn (10-18 mol%). Zusätzlich weist Mfp-3f einen erhöhten Anteil an DOPA (> 20 mol%) und 4-Hydroxyarginin (HyR, 12 – 24 mol%), sowie positiv geladener AS-Reste (26 mol%) auf. Hingegen enthalten Mfp-3s eine niedrigere DOPA-Konzentration (5-10 mol%) und haben eine geringere Ladungsdichte (3 – 9 mol% positiv geladener Reste) [Silverman und Roberto, 2007]. Es gibt darüber hinaus eine große Variation in den Sequenzvarianten aufgrund der post-translationalen Modifikationen von Tyr zu DOPA und Arginin zu HyR [Inoue et al., 1996; Waite und Andersen, 1978b]. Dabei liegen 40 bis 80 % der Arginine in Mfp-3 hydroxyliert vor (HyR) [Papov et al., 1995]. In dieser Studie wurden ebenfalls Peptid-*Mapping*-Untersuchungen durchgeführt. Die Daten deuten darauf hin, dass eine Interaktion zwischen den zusätzlichen Hydroxylgruppen in HyR und DOPA besteht, sowie die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Im Bezug auf die Adhäsion von Muscheln ist die Rolle von HyR in Mfp-3 in der Literatur bislang nicht vollständig geklärt.

Die Muschelfußproteine-3 der Organismen *Mytilus edulis* (Mefp-3) und *Mytilus galloprovincialis* (Mgfp-3) wurden in den vergangenen Jahrzehnten am besten charakterisiert und für diverse Anwendungen untersucht [Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005; Hwang und Waite, 2012; Vreeland et al., 1998; Wang und Scheibel, 2018b; Yu et al., 2011b]. Mefp-3 und Mgfp-3 besitzen eine Sequenzähnlichkeit von 58,3 % (Abb. 1-9). Die Variante aus *M. galloprovincialis* konnte bereits rekombinant in *E. coli* produziert und die adhäsiven Eigenschaften nachgewiesen werden [Hwang et al., 2005; Yang et al., 2013]. In der Literatur ist Mefp-3 umfangreicher charakterisiert, wurde aber noch nicht erfolgreich in einem heterologen Organismus produziert [Hwang und Waite, 2012; Hwang et al., 2010; Silverman und Roberto, 2007]. Aus diesem Grund war ein Vergleich beider Mfp-3 von Interesse, um etwaige, sequenzabhängige Unterschiede in den adhäsiven Eigenschaften zu untersuchen.

**Mefp-3f**      ADYYGPNYGP<sup>Y</sup>PP<sup>R</sup>RYGGGN<sup>Y</sup>N<sup>R</sup>Y<sup>N</sup>R<sup>Y</sup>G<sup>R</sup>RYGGYK<sup>Y</sup>GW<sup>N</sup>NG<sup>W</sup>N<sup>R</sup>G<sup>R</sup>RGK<sup>Y</sup>W-  
**Mgfp-3**      ADYYGPKYGP<sup>Y</sup>PP<sup>R</sup>RYGGGN<sup>Y</sup>N---R<sup>Y</sup>G<sup>R</sup>RYGGYK<sup>Y</sup>GW<sup>N</sup>NG<sup>W</sup>K<sup>R</sup>G<sup>R</sup>WG<sup>R</sup>K<sup>Y</sup>Y<sup>Y</sup>  
 \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*      \*\*\*\*\*:\*\*\* \*: :

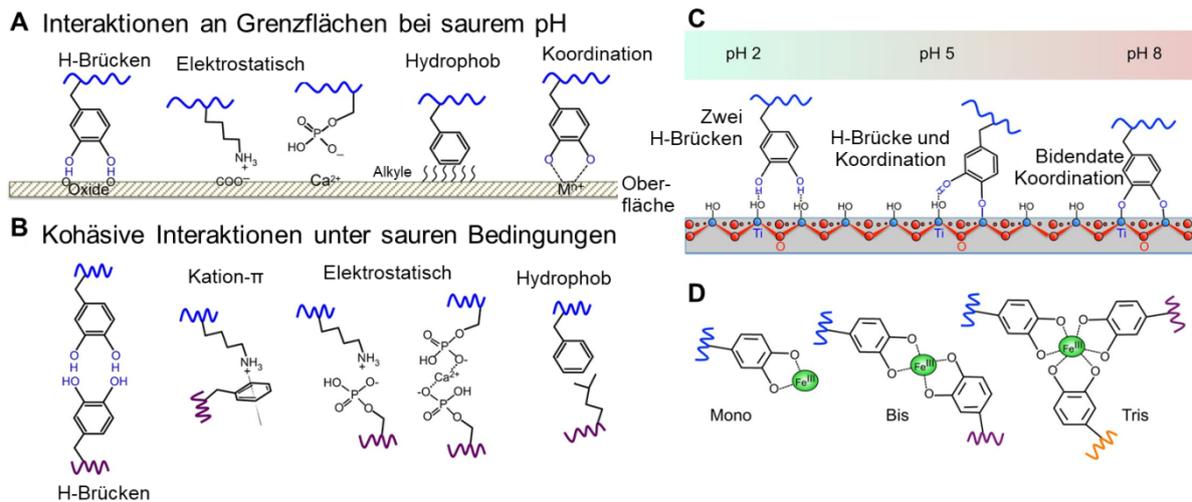
**Y = DOPA**      **R = HyR**

**Abb. 1-9 Sequenz-Alignment von Mefp-3f aus *Mytilus edulis* und Mgfp-3 aus *Mytilus galloprovincialis* auf Proteinebene**

Erstellt mit dem *open source Programm* Clustal Omega (1.2.1, EMBL-EBI) unter Verwendung der Standardeinstellungen. Sequenz Mefp-3f, Uniprot: Q9NAV2, Sequenz Mgfp-3, Uniprot: Q9GUX8. Blau – Y mit potenzieller Hydroxylierung zu DOPA, Orange – R mit potenzieller Hydroxylierung zu Hydroxyarginin (HyR), Gelb – Sequenzbereiche mit deutlichem Unterschied.

#### 1.4.1.1.2 DOPA als Schlüsselmolekül natürlicher Adhäsion

L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) wird in der Literatur als Schlüsselmolekül für die Klebeeigenschaften mariner Organismen beschrieben [Deming, 1999; Lee et al., 2006]. Die hohe Konzentration an DOPA (bis zu 30 mol%) in den Mfp ist für eine starke Haftung der Muscheln an verschiedene Rohstoffe wie Felsen, Holz (Schiffe) und Pflanzenfasern (Seile) unter extremen Bedingungen unerlässlich. Der Grad an Hydroxylierung variiert je nach Muschel und den äußeren Einflüssen [Floriolli et al., 2000]. In natürlichen Muschelfußproteinen wurde stets eine Mischung von Mfp-Varianten mit unterschiedlichem Hydroxylierungsgrad nachgewiesen, so dass je nach Bedarf der Muschel die Anzahl an Hydroxylierungen in den Proteinspezies variiert [Floriolli et al., 2000; Papov et al., 1995; Roberto und Silverman, 2010]. DOPA trägt über verschiedene im Folgenden aufgeführten Mechanismen zur Adhäsion von Muscheln bei (Abb. 1-10 A+B): H-Brückenbindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Metall-Catechol-Koordination, Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen des aromatischen Ringsystems [Gebbie et al., 2017; Kord Forooshani und Lee, 2017; Rev.; Waite, 2017]. Starke nicht-kovalente Wechselwirkungen (H-Brückenbindungen oder  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen) wurden bereits zwischen den Catechol-Gruppen und anorganischen Substraten wie Glas oder Glimmer (*mica*) von verschiedenen Wissenschaftlern untersucht [Anderson et al., 2010; Li und Zeng, 2016; Mian et al., 2014]. Im Falle von Metalloxiden (z.B.  $\text{TiO}_2$ ) wird angenommen, dass die Catechol-Gruppen starke Metall-Catechol-Koordinationsbindungen ausbilden [Rodríguez et al., 1996]. Bei hydrophoberen Oberflächen oder sogar inerten Polymermaterialien wird vermutet, dass die hydrophoben Wechselwirkungen ( $\pi$ -Stapelkräfte und Van-der-Waals-Kräfte) zwischen dem Catechol und dem Substrat zu der starken Wechselwirkung beitragen [Li et al., 2014; Yu et al., 2013]. Aus diesem Grund ist die DOPA-Chemie und deren Anwendung für die Materialwissenschaften von großem Interesse.



**Abb. 1-10 Vielfalt der DOPA-Chemie für die Adhäsion modifiziert nach [Rev.; Waite, 2017]**

Mögliche Bindungsmechanismen der Catechol-Seitenkette (DOPA). (A) Interaktionen an Grenzflächen bei saurem pH: H-Brückenbindungen, elektrostatische, hydrophobe und koordinative Wechselwirkungen. (B) Kohäsive Interaktionen der Mfp unter sauren Bedingungen: H-Brückenbindungen, Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen, elektrostatische (z.B. Salzbrücken) und hydrophobe Wechselwirkungen. (C) Die Catechol-Bindung an Metalloxid-Oberflächen ändert sich von H-Brückenbindungen bei saurem pH-Wert zu kovalenter Bindung im Meerwasser (pH 8,0). (D) Die Metallkoordination durch Catechole (DOPA). Mit steigendem pH-Wert steigt die Vernetzung bis zu drei bei einem pH-Wert von 8,0.

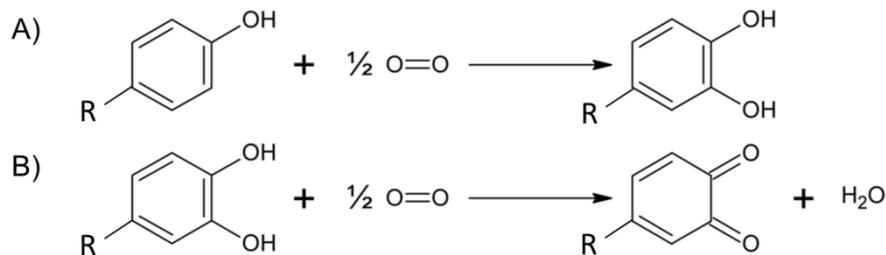
Neben dieser Vielfalt an Adhäsionsmöglichkeiten DOPA-enthaltener Proteine tragen Umgebungsbedingungen wie pH-Wert und Salzkonzentration (Leitfähigkeit) maßgeblich zum Bindungsprozess bei [Guerette et al., 2013; Kan et al., 2014]. In der Natur befinden sich die Mfp zunächst in der Muschelsekretionsdrüse, die einen leicht sauren pH-Wert von ca. 5,5 besitzt [Yu et al., 2011a]. Die Exposition in Meerwasser (pH 8,2) induziert die Vernetzung der Mfp (Abb. 1-10C+D) [Hwang et al., 2013; Martinez Rodriguez et al., 2015; Waite, 2017]. Die optimale Haftung der Muschel erfordert ein mittleres Maß an DOPA-Vernetzung, da sowohl adhäsive als auch kohäsive Kräfte für eine starke Bindung notwendig sind.

Obwohl Mfp starke adhäsive Eigenschaften aufweisen, ist ihre Verfügbarkeit limitiert. Für die Gewinnung von 1 g Mfp werden ~ 10000 Muscheln benötigt [Cha et al., 2008]. Kommerziell werden nativ gewonnene Mfp als Corning™ Cell-Tak (Thermo Fischer Scientific) für 273 €/mg oder MAPTriX™ (Kollodis Biosciences) für 50 €/mg angeboten (Stand: 03/2022). Aus diesem Grund sind alternative Ansätze wie die rekombinante Produktion der Mfp (I), Muschel-ähnliche Peptide (II), synthetische Catechol-Polymere (III) oder andere biomimetische Ansätze (IV) immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt [Brennan, 2015; Brubaker und Messersmith, 2011; Cha et al., 2009; Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2007; Wang und Scheibel, 2018a; Wang und Scheibel, 2018b].

Die heterologe Produktion von Mfp ist in den vergangenen 20 Jahren Gegenstand intensiver Forschung gewesen. In *E. coli* konnten rekombinant bereits Mfp-3 und Mfp-5 aus *M. galloprovincialis* produziert werden [Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2004; Yang et al., 2013]. Auch die Produktion eines Fusionsproteins (fp-353) aus Mgf-3 und Mgf-5 in *E. coli* war erfolgreich und fp-353 zeigte gute Bindeeigenschaften im Vergleich mit kommerziell erhältlichem Fibrinkleber [Gim et al., 2008].

### 1.4.1.1.3 Enzymatische Hydroxylierung von Tyrosinen in Mfp-basierten Biomaterialien

Die post-translationale Modifikation DOPA wird in Proteinen durch die Hydroxylierung von Tyr in *ortho*-Position zur OH-Gruppe am Phenolring erreicht. Diese Modifikation wird enzymatisch generiert [Deming, 1999; Lee et al., 2011]. Wie bereits in Kapitel 1.4.1.1 (S. 12) erwähnt, konnte bis heute keine Tyrosyl-Hydroxylase in Muscheln identifiziert werden. Da dennoch die Hydroxylierung von Tyr in Proteinen und deren Einfluss im Detail untersucht werden sollte, nutzten Wissenschaftler ein anderes Enzym aus dem Pilz *Agaricus bisporus* für die *in vitro* Hydroxylierung Mfp-enthaltener Sequenzen. Marumo und Waite beschrieben erstmals die optimalen Bedingungen sowie die Limitierungen zur Umwandlung von Tyr sowie Tyr-enthaltener Sequenzen zu DOPA mit Hilfe der Pilz-Tyrosinase (Sigma) [Marumo und Waite, 1986]. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten unter den getesteten Bedingungen eine Umwandlung von 70 % des freien Tyr zu DOPA und in kurzen synthetischen Di- oder Tripeptiden eine ähnliche Ausbeute (60 – 88 %). In einem Mfp-basierten Decapeptid wurden jedoch nur ~ 40 % der Tyr zu DOPA hydroxyliert. Trotz des zum Teil niedrigen Hydroxylierungsgrades wird die kommerziell erhältliche Tyrosinase aus *A. bisporus* seitdem in der Literatur vielfach für die Modifikation zu DOPA in Mfp-enthaltene Sequenzen eingesetzt [Brennan, 2015; Cha et al., 2009; Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005; Wang und Scheibel, 2018a; Yang et al., 2013].



**Abb. 1-11** Reaktionsgleichungen der Tyrosinase-katalysierten *o*-Hydroxylierung von Monophenol zu Brenzcatechin, kurz Catechol (A) und der Oxidation von *o*-Catechol zu 1,2-Benzochinon (B) [Pretzler et al., 2017]. R = H oder andere Substituenten.

Die Tyrosinase gehört zur Enzymklasse der Oxidoreduktasen (EC 1.14.18.1), die im Allgemeinen in einer Vielzahl von Bakterien, Pilzen, Pflanzen, Insekten und Säugetieren vorkommt und an der Biosynthese von Melanin beteiligt ist [Plonka und Grabacka, 2006]. Das Enzym katalysiert die *ortho*-Hydroxylierung von Phenol und die Oxidation des resultierenden Catechols zu *o*-Chinon (Abb. 1-11). Letztere sind instabil und polymerisieren typischerweise zu Melaninpigmenten. In Gegenwart von Reduktionsmitteln wie Ascorbinsäure und Thiolen kann das Catechol aus dem *o*-Chinon regeneriert werden. Die Tyrosinase ist ein Kupfer-abhängiges Enzym, wobei sich die Cu(II)-Ionen in der Bindestelle für molekularen Sauerstoff befinden. Zudem weist die Tyrosinase zwei Bindestellen für aromatische Substrate auf [Duckworth und Coleman, 1970]. Die kommerziell erhältliche Tyrosinase aus *A. bisporus* hat ein MW von 119,5 kDa, einen pI von 4,7 – 5 und ein pH-Optimum von 6 – 7 [Gillespie et al., 1991; Gutteridge et al., 1977; Robb und Gutteridge, 1981]. Bei enzymkinetischen Untersuchungen wurden ähnliche  $K_M$ -Werte für mono- und diphenolische Substrate bestimmt: 0,2 mM (L-Tyr) und 0,17 mM (L-DOPA) [Selinheimo et al., 2009]. Obwohl die Pilz-Tyrosinase in der Literatur zur Modifikation von Tyr zu DOPA in Muschel-basierten Polypeptiden vielfach eingesetzt wird, stellt die geringe Umwandlungsrate von ~ 15 – 40 % Peptid-gebundener Tyr zu DOPA eine Limitierung für die Anwendung dar [Akemi Ooka und Garrell, 2000; Hwang et al., 2005; Marumo und Waite, 1986; Wang und Scheibel, 2018b; Yu und Deming, 1998]. Zur Maximierung der Adhäsionseigenschaften wäre die Modifikation aller Tyr optimal.

Eine Alternative bieten mikrobielle Tyrosinasen (mTyr), die bei Peptid-gebundenen Tyr einen höheren Hydroxylierungsgrad zu DOPA aufweisen [Axambayeva et al., 2018; Do et al., 2017; Fairhead und Thöny-Meyer, 2010; Zaidi et al., 2014]. Bakterien produzieren Tyrosinasen zur Melaninproduktion, welches im Organismus diverse protektive Eigenschaften ausübt und für das Überleben wichtig ist [Faccio et al., 2012]. Melanin schützt die bakterielle DNA vor Schäden durch UV-Strahlung sowie reaktiven Sauerstoffspezies, und kann zudem toxische Schwermetalle binden [Garcia-Rivera und Casadevall, 2001; Geng et al., 2008]. Insgesamt gibt es sechs verschiedene bakterielle Tyrosinase-Typen, die nach der Organisation der Domänen und dem möglichen Bedarf an einem *Caddie*-Protein (Helferprotein) für die Enzymaktivität klassifiziert sind [Faccio et al., 2012]. Die Tyrosinase aus *Verrucomicrobium spinosum* (Typ III Tyrosinase) zeigte bislang die höchste spezifische Aktivität unter allen getesteten mikrobiellen Tyrosinasen und ist somit für biotechnologische Anwendungen von großem Interesse [Fairhead und Thöny-Meyer, 2010]. Die Typ III Tyrosinasen werden unter natürlichen Bedingungen durch ihre C-terminale Domäne reguliert. Das Entfernen der Domäne führt zu einer etwa 100-fach höheren Aktivität. Eine entsprechend verkürzte Variante des Enzyms wurde bereits aktiv in *E. coli* produziert und zur Modifikation eines Mfp-Fusionsproteins verwendet [Axambayeva et al., 2018]. Das resultierende aktive Enzym besitzt eine Größe von 36,5 kDa und ein pH-Optimum zwischen 6 – 8.

Neben der hohen spezifischen Aktivität ist die mikrobielle Tyrosinase (mTyr) auch aus folgendem Grund interessant für die DOPA-Modifikation von Mfp-basierten Sequenzen. Während die Pilz-Tyrosinase aus *A. bisporus* ähnliche  $K_M$ -Werte für mono- und diphenolische Substrate zeigt, ist der  $K_M$ -Wert der mTyr für monophenolische Substrate um den Faktor 30 niedriger als für Diphenole (0,26 mM L-Tyr / 7,9 mM L-DOPA) [Fairhead und Thöny-Meyer, 2010]. Somit ist die mTyr Reaktion spezifischer für die gewünschte Reaktion zum Catechol.

### 1.4.2 Kohäsive Protein-Blöcke

Neben adhäsiven Proteinen ist in der Literatur auch eine Vielzahl von Proteinsequenzen mit kohäsiven Eigenschaften beschrieben. Eine Übersicht ausgewählter Proteine befindet sich in Tabelle 1-3 (S. 18): Resilin-ähnliche Polypeptide (RLP – *resilin-like peptides*) aus *Drosophila melanogaster* (i), ein Triblock CL-SL-SL-CL (CL – *collagen-like*, SL – *silk-like*) (ii), der Leucin-Zipper (iii) sowie Elastin-ähnliche Sequenzen (ELP – *elastin-like peptides*) (iv).

**Tabelle 1-3 Übersicht kohäsiver Proteine**

Protein	Herkunft	Art	MW (kDa)	Heterologe Produktion	Literatur
(i) RLP	Taufliege	<i>Drosophila melanogaster</i>	25,3	<i>E. coli</i>	[Qin et al., 2011]
(ii) CSSC	Mensch (C), Seiden-spin-ner (S)	<i>Homo sapiens</i> , <i>Bombyx mori</i>	65,5	<i>P. pastoris</i>	[Martens et al., 2009a; Martens et al., 2009b]
(iii) Leu-Zipper	synthetisch		4,8	<i>E. coli</i>	[Shen et al., 2007; Shen et al., 2005]
(iv) ELP	Mensch	<i>Homo sapiens</i>	30,7	<i>E. coli</i> , <i>P. pastoris</i>	[Desai und Lee, 2015; Desai et al., 2016]

RLP – Resilin-ähnliche Polypeptide, CSSC – C = Kollagen-ähnliche Polypeptide, S = Seiden-ähnliche Polypeptide, ELP – Elastin-ähnliche Polypeptide.

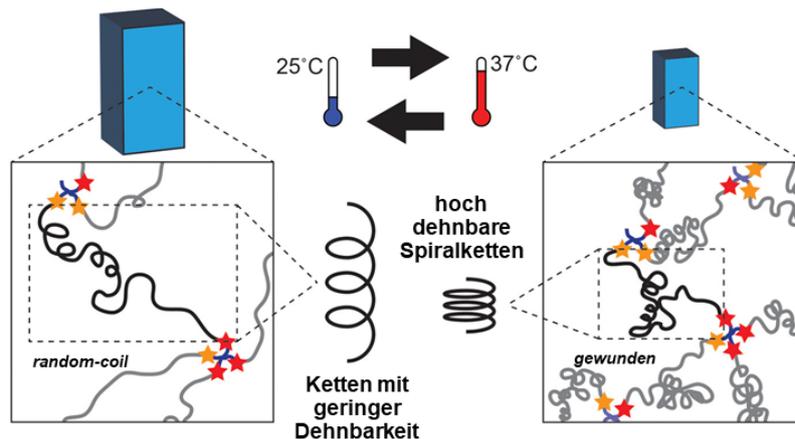
- (i) RLP, bestehend aus dem Pentadecapeptid *repeat* (GGRPSDSYGAPGGGN), besitzt hervorragende mechanische Eigenschaften wie eine geringe Steifigkeit und hohe Elastizität. Verschiedene rekombinante RLP wurden bereits erfolgreich in *E. coli* produziert und wiesen eine hohe Zugfestigkeit im Materialtest auf [Qin et al., 2011; Su et al., 2014].
- (ii) Das Triblock-Copolymer (A-B-A) besteht aus einem Kollagen-ähnlichen Block (A = CL) und einem pH-responsiven Seidenprotein-ähnlichen Block (B = SL), und wird in der Literatur als CSSC bezeichnet. Das Polymer konnte bereits erfolgreich nach Produktion in *Pichia pastoris* aufgearbeitet und charakterisiert werden [Martens et al., 2009a; Martens et al., 2009b]. Die Hydrogele zeigten eine außergewöhnliche Festigkeit durch die Ausbildung von definierten Schleifenstrukturen (engl. *ribbons*) im SL-Block bei niedrigem pH-Wert, während der CL-Block unstrukturiert (engl. *random-coil*) bleibt.
- (iii) Der Leucin-*Zipper* ist ein helikales Peptid mit einer Periodizität von  $(abcdefg)_n$  (Position a und d sind häufig Leucine). Unter bestimmten Bedingungen können diese Helices in starke intra- und intermolekulare Interaktionen treten und ein dreidimensionales Polymer-Netzwerk ausbilden [Petka et al., 1998; Shen et al., 2005]. Es wurde bereits gezeigt, dass dieser Prozess vor allem vom pH-Wert und der vorherrschenden Salzkonzentration abhängig ist [Shen et al., 2007]. Somit können Leucin-*Zipper*-Sequenzen als responsive Elemente für das Protein-Design eingesetzt werden.
- (iv) ELP sind aus nativen sich wiederholenden Elastin-Motiven aufgebaut. Diese repetitive Einheiten verleihen Elastin seine besonderen Eigenschaften wie kohäsive Stärke und Flexibilität [Gray et al., 1973]. Um diese Eigenschaften in den Materialwissenschaften nutzen zu können, wurden Elastin-ähnliche Sequenzen (ELP) entwickelt, die diese Eigenschaften natürlichen Elastins nachempfinden. Unterschiedliche ELP-Sequenzen wurden bereits erfolgreich in *E. coli* produziert und vielversprechende Materialeigenschaften gezeigt [Desai und Lee, 2015; Desai et al., 2016].

Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Designer-Proteine wurden Elastin-ähnliche Sequenzen (ELP) als kohäsive Blöcke verwendet. Diese besitzen die einzigartigen Eigenschaften von Elastin, kohäsive Stärke und Flexibilität, und eignen sich zur Nutzung als Biomaterial. Es wurde eine ELP-Sequenz verwendet, die bereits erfolgreich in *E. coli* produziert werden konnte [Desai und Lee, 2015; Desai et al., 2016]. Darüber hinaus sind ELP thermoresponsiv und es ist eine einfache sowie kostengünstige Reinigung mittels *Inverse transition cycling* (ITC) möglich. Dabei wird der reversible Temperaturübergang von ELP oder ELP-fusionierten Proteinen genutzt, von einer hauptsächlich unstrukturierten Anordnung (*random-coil*) bei Raumtemperatur zu geordneten intra- und intermolekularen  $\beta$ -Helix-Strukturen [Ge et al., 2006; Meyer und Chilkoti, 2002; Yeboah et al., 2016]. Diese Eigenschaft eignet sich zudem für die Entwicklung eines flexiblen Klebers, der erst bei Erhöhung der Umgebungstemperatur seine typischen Strukturen ausbildet. In der Literatur zeigte rekombinant produziertes ELP physikalische und mechanische Eigenschaften, die dem nativen Elastin sehr ähnlich sind [Chow et al., 2006; Collins et al., 2014; Malik, 2016; McPherson et al., 1996]. Aufgrund der attraktiven biochemischen Eigenschaften von ELP, der bereits beschriebenen heterologen Produktion in *E. coli* und der vergleichsweise einfachen und schnellen Reinigung wurden ELP als kohäsive Blöcke für das Design der Proteine in der vorgelegten Arbeit verwendet und werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

### 1.4.2.1 Elastin-ähnliche Sequenzen

Elastin ist verantwortlich für die Elastizität und Belastbarkeit vieler Gewebe (Blutgefäße, Lunge, Herz, Haut) und ist bekannt für seine außergewöhnliche Haltbarkeit [Partridge, 1963]. Natürliches Elastin besteht aus sich wiederholenden Sequenzmotiven wie z.B. VPGVG, GGVP oder GVGVP, welche dem Protein seine besonderen Eigenschaften wie kohäsive Stärke und Flexibilität verleiht [Gray et al., 1973]. Tropoelastin (TE) ist eine lösliche Vorstufe (*precursor*) von Elastin, welches zusammen mit zahlreichen anderen Proteinen elastische Fibrillen in der extrazellulären Matrix ausbildet [Schmelzer und Duca, 2021]. In der TE-Sequenz befinden sich hydrophile Domänen bestehend aus Lys-Resten, die zum Teil in reifen Elastin *in vivo* quervernetzt sind, und hydrophobe Domänen, die repetitive Motive aus Gly, Val und Pro enthalten [Floss et al., 2010; Vrhovski und Weiss, 1998]. Die hydrophoben Domänen sind vor allem für die Elastizität von TE verantwortlich [Urry et al., 1976].

Um diese Eigenschaften in der Materialwissenschaft nutzen zu können, wurden Elastin-ähnliche Polypeptide (ELP) untersucht, die aus nativen Elastin-Motiven aufgebaut sind. Eines der am häufigsten untersuchten ELP ist das sich wiederholende Pentapeptid  $(VPGXG)_n$ , wobei X eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Pro sein kann [Maskarinec und Tirrell, 2005; Rodríguez-Cabello et al., 2006]. Das am häufigsten vorkommende Pentapeptid-Motiv ist  $(VPGVG)_n$  [Gray et al., 1973; Venkatachalam und Urry, 1981] und steht im Fokus der vorliegenden Arbeit. Eine Besonderheit von TE und ELP ist der reversible Temperaturübergang von einer hauptsächlich unstrukturierten Anordnung (*random-coil*) bei Raumtemperatur zu geordneten intra- und intermolekularen  $\beta$ -Helix-Strukturen ( $\beta$ -*spiral*, mit einem Typ II  $\beta$ -*turn* pro Pentamer) bei einer sequenzspezifischen Übergangstemperatur ( $T_t$ , engl. *transition temperature*) (Abb. 1-12) [Girotti et al., 2004]. Dadurch werden die hydrophoben Interaktionen verstärkt und es kommt zur Agglomeration (Koazervierung) der Polypeptidketten. ELP können somit als thermoresponsive Elemente genutzt werden [Lee et al., 2000]. Die niedrige kritische Lösungstemperatur (*lower critical solution temperature*, LCST) der ELP kann durch Anpassung des Molekulargewichts eingestellt werden [Meyer und Chilkoti, 1999]. Mit einer größeren Anzahl an Pentapeptid-*repeats* in den ELP (höheres MW), verringert sich die spezifische  $T_t$ .

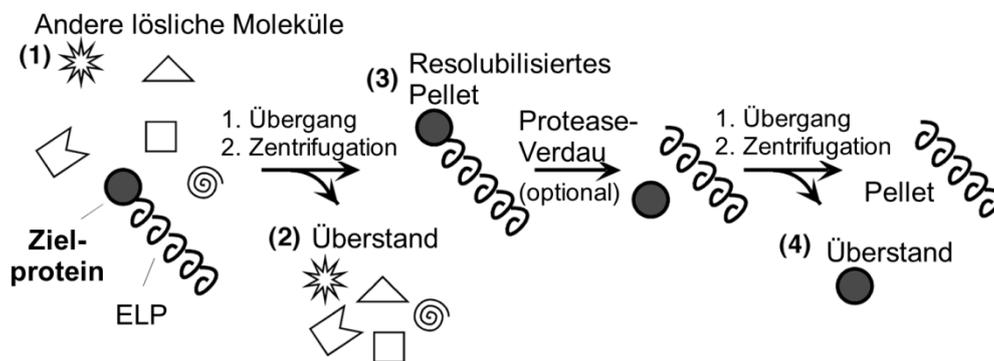


**Abb. 1-12 Reversibler Temperaturübergang bei ELP von einer relativ unstrukturierten Anordnung (*random-coil*) zu inter- & intramolekularen Interaktionen (hoch dehnbare Spiralketten) unter physiologischen Bedingungen ( $T = 37^\circ\text{C}$ ) [Desai et al., 2016]**

Die biochemische Charakterisierung des Temperaturübergangs erfolgte mit rekombinant produzierten ELP. Die in *E. coli* produzierten ELP besitzen physikalische und mechanische Eigenschaften, die dem nativen Elastin sehr ähnlich sind [Chow et al., 2006; Collins et al., 2014; Malik, 2016; McPherson et al., 1996]. In der Literatur konnten bereits  $1,6\text{ g/L}_{\text{Kultur}}$  reines ELP

aus Schüttelkolbenkultivierung sowie  $4,3 \text{ g/L}_{\text{Kultur}}$  einer ELP-Fusion mit einem Seiden-ähnlichen Motiv aus der Seidenspinnerraupe im Bioreaktor erreicht werden [Chow et al., 2006; Collins et al., 2014]. Daher ist  $(\text{VPGXG})_n$  ein vielversprechendes Motiv für *Protein Engineering* von bio-inspirierten Materialien.

Für die Reinigung von ELP aus *E. coli* kann der reversible Temperaturübergang durch das *Inverse transition cycling* (ITC) genutzt werden, um das Zielprotein gezielt von Wirtsproteinen abzutrennen [Ge et al., 2006; Meyer und Chilkoti, 2002; Yeboah et al., 2016]. Zu den Vorteilen dieser Reinigungsmethode, im Vergleich zu chromatografischen Methoden, gehören (i) geringer technischer Aufwand, (ii) Skalierbarkeit, (iii) schnelle Durchführung sowie (iv) vergleichsweise geringe Kosten. In Abb. 1-13 ist der allgemeine Prozess des ITC für Fusionsproteine mit ELP vereinfacht dargestellt. Das ELP-Fusionsprotein liegt zunächst in einem komplexen Gemisch (z.B. Zellysate) vor. Durch Temperaturerhöhung auf  $T_t$  der Lösung und/oder Zugabe von Salz wird der inverse Übergang ausgelöst, wodurch das ELP-Fusionsprotein aggregiert. Nach Zentrifugation bei  $T_t$  verbleiben andere Proteine (Verunreinigungen) im Überstand und das ELP-Fusionsprotein im Pellet. Das Fusionsprotein wird durch Resuspension mit einem Puffer bei einer Temperatur unterhalb von  $T_t$  und/oder geringerer Salzkonzentration gewonnen. Falls eine spezifische Protease-Schnittstelle zwischen ELP-tag und Zielprotein (*target protein*) eingebaut wurde, kann der Verdau anschließend durchgeführt werden. Final erfolgt eine weitere Runde ITC, um das Zielprotein vom ELP-tag abzutrennen, wobei das Zielprotein im Überstand verbleibt. Durch die optimale Kombination der kritischen Parameter (MW des ELP, T und Ionenstärke der Lösung) kann das ELP-Fusionsprotein aus einem komplexen Gemisch einfach gewonnen werden [Meyer und Chilkoti, 2002].



**Abb. 1-13 Schematische Darstellung der ELP-basierten Proteinaufreinigung durch ITC [Meyer und Chilkoti, 2002].**

In Forschungsarbeiten der vergangenen 20 Jahre wurden bereits viele Aspekte der heterologen Produktion von ELP untersucht. In der Arbeit von Meyer und Kollegen wurden verschiedene ELP-Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* produziert. Nach der Reinigung mittels ITC konnten Ausbeuten von  $40 - 70 \text{ mg/L}_{\text{Kultur}}$  erreicht werden [Meyer und Chilkoti, 1999]. Christensen und Kollegen zeigten, dass die Positionierung von ELP am C-Terminus des Zielproteins (Protein-ELP) zu einer höheren Expression und folglich zu einer höheren Ausbeute führte (bis  $\sim 90 \text{ mg/L}_{\text{Kultur}}$ ) [Christensen et al., 2009].

Durch die Zugabe von Glycerin und bestimmter Aminosäuren zum Kultivierungsmedium konnten Chow und Kollegen die Ausbeuten von einer Fusion aus GFP-ELP stark verbessern [Chow et al., 2006]. Überraschenderweise zeigten auch andere als in den ELP vorkommenden AS wie z.B. Asn, Asp, Gln und Glu einen positiven Effekt auf die Proteinausbeute, sogar in einem komplexen Medium. Somit konnte im Vergleich zum üblicherweise verwendeten LB-Medium die Ausbeute im Schüttelkolben mit dem optimierten Medium um das 36-fache auf  $1,6 \text{ g/L}_{\text{Kultur}}$

erhöht werden. Mit dieser Studie konnte somit ein nützlicher Ansatz zur Verbesserung der Ausbeute von ELP-Fusionsproteinen, aber auch anderer repetitiver Polypeptide gezeigt werden.

### 1.4.3 Linker-Sequenz als Protein-Baustein

Die adhäsiven und kohäsiven Blöcke wurden in den Designer-Proteinen mit einem Gly-Ser-Linker  $(GGGS)_n$  verbunden, welcher standardmäßig als flexibler Linker für rekombinante Fusionsproteine in *E. coli* verwendet wird [Dai et al., 2017; Huston et al., 1988; Trinh et al., 2004]. Durch Anpassung der Anzahl an Wiederholungen (n) kann die Länge des GS-Linkers optimiert werden, um eine angemessene Trennung der funktionellen Domänen zu erreichen oder die notwendigen Wechselwirkungen zwischen den Domänen aufrechtzuerhalten. In der Literatur wird häufig eine Anzahl von  $n = 1 - 3$  verwendet [Chen et al., 2013]. Der Linker in den Designer-Proteinen soll eine sterische Behinderung zwischen den kohäsiven und adhäsiven Blöcken und somit eine Beeinträchtigung der funktionellen Eigenschaften vermeiden.

### 1.4.4 Protein-tags als Protein-Bausteine

Als Protein-*tag* wurde in der vorgelegten Arbeit für die Designer-Proteine (DP) ein N-terminaler His<sub>6</sub>-SUMO-*tag* (engl. *Small Ubiquitin-related MODifier*) verwendet [Malakhov et al., 2004; Marblestone et al., 2006]. Dieser ermöglicht neben der Aufarbeitung über die Affinitätschromatografie (IMAC), auch eine überhangsfreie Abtrennung des His<sub>6</sub>-SUMO-*tags* mit Hilfe der SUMO-Protease 1 (ScUlp1), um einen nativen N-Terminus zu generieren. Des Weiteren konnte die Verwendung eines SUMO-*tags* bei einigen rekombinanten Proteinen eine Verbesserung der Expression, Löslichkeit, Reinigung und zur Verringerung des proteolytischen Abbaus beitragen [Butt et al., 2005]. Neben dem His<sub>6</sub>-SUMO-*tag* zur chromatografischen Reinigung wurde in einem weiteren DP ein c-myc-*tag* zur Detektion mittels Western-Blot integriert. Der c-myc-*tag* ist ein kleiner, immunreaktiver Decapeptid-*tag* (N-EQKLISEEDL-C) und wurde 1985 das erste Mal beschrieben [Evan et al., 1985]. Er eignet sich ideal für immunbiologische Nachweise und kann an den N-Terminus, den C-Terminus oder intern im Zielprotein eingebaut werden.

## 1.5 Herausforderungen bei der Produktion rekombinanter Proteine

Aus der Literatur ist bekannt, dass es bei der rekombinanten Produktion von Proteinen zu Problemen wie Abbau oder Faltungsproblemen kommen kann [Baneyx und Georgiou, 1991; Meerman und Georgiou, 1994; Rozkov und Enfors, 2004]. Häufig führen co-translational auftretende Faltungsfehler zu Translationsabbrüchen oder Proteolyse [Baneyx und Mujacic, 2004; Joseph et al., 2015; Singha et al., 2017]. Ein gewisses Risiko für die Produktion neuartiger Protein-basierter Materialien in heterologen Organismen besteht. Deswegen erfolgte das Protein-Design, die Wahl des Produktionsstammes, der Kultivierungsbedingungen, als auch der Proteinreinigung in der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung dieser Aspekte. Darüber hinaus wurde der Produktionsprozess der Designer-Proteine an Literaturdaten angelehnt, wie es für die einzelnen Protein-Blöcke bereits beschrieben ist.

Auch bei der Maßstabsvergrößerung zur Gewinnung größerer Mengen an gereinigten rekombinanten Proteinen kann es zu Herausforderungen kommen und eine einfache Übertragung auf einen größeren Maßstab ist oft nicht möglich. Dies betrifft sowohl den *Upstream*- [Krausch et al., 2020; Tripathi, 2009; Wurm, 2016] als auch den *Downstream*-Prozess [Prokopakis und

Asenjo, 2020], da oft die Dauer des Verfahrens deutlich zunimmt. Dazu gehören die Dauer der Zellabtrennung, des Zellaufschlusses (intrazelluläres Zielprotein) und der Produktreinigung (chromatografisch oder nicht-chromatografisch).

Trotz der bekannten Herausforderungen, bietet die rekombinante Proteinproduktion klare Vorteile (einfache genetische Manipulation, niedrige Kosten und einfache Kulturbedingungen, kurze Proteinexpressionszeit, hohe Reproduktionsrate) und wurde für die Herstellung der Designer-Proteine verwendet.

## 1.6 Motivation

Bio-basierte Bindemittel auf Proteinbasis stellen eine vielversprechende Alternative in den Materialwissenschaften dar (Kap. 1, S. 1). Dies gilt insbesondere für die Herstellung von Spanplatten und im Formsandbau, da die Mehrheit der eingesetzten Bindemittel Formaldehyd enthält [Kloeser et al., 2007]. Formaldehyd-basierte Bindemittel sind sehr effizient. Jedoch ist es seit der Neuklassifizierung von Formaldehyd als karzinogene Verbindung durch die WHO ein wichtiges Ziel, die Verwendung und Exposition zu verhindern [Carvalho et al., 2012; Marutzky, 2008]. Als bio-basierte Alternative werden Proteine für diesen Ansatz bereits seit längerem untersucht [Krug und Tobisch, 2010; Weber und Krug, 2005].

Derzeit werden vor allem im medizinischen Bereich künstliche Proteine als bio-basierte Bindemittel verwendet [Von Byern und Grunwald, 2010]. Dazu zählen unter anderem die Verwendung als Wundkleber, Biomaterialien zur Wundheilung oder zum Knochenaufbau, Herstellung von Hydrogelen oder Systeme zur gezielten Wirkstoffabgabe [Dinjaski und Kaplan, 2016; Forooshani et al., 2017]. Mit der Nutzung von künstlichen Proteinen im materialwissenschaftlichen Bereich zur Verklebung von Verbundmaterialien kann somit eine noch weitestgehend unerforschte Nische bio-basierter Bindemittel untersucht werden.

Neben der Senkung der Formaldehydemission bietet die Nutzung Protein-basierter Bindemittel die Möglichkeit, künftig Ausgangsstoffe auf Basis fossiler Rohstoffe durch nachwachsende Rohstoffe zu ersetzen. Demzufolge stellen Bindemittel auf Proteinbasis durch die bevorstehende Endlichkeit der Erdölprodukte und der damit verbundenen Preissteigerung eine lohnenswerte und Formaldehyd-freie Alternative dar. Zusätzlich ist der ökologische Aspekt durch eine deutliche Senkung der CO<sub>2</sub>-Emission bei der rekombinanten Herstellung und Verwendung Protein-basierter Bindemittel von Bedeutung.

Darüber hinaus können durch das Design künstlicher Proteine die Eigenschaften natürlicher Proteine verbessert und für die spezifische Anwendung optimiert werden. Ein rational designed Protein zeigte bereits eine Zug-Scher-Kraft von ca. 2,6 MPa bei der Verklebung von Aluminiumplatten [Brennan et al., 2017]. Im Vergleich dazu wies ein herkömmlicher synthetischer Mehrzweckkleber (*Elmers Glue-All*, Elmer's Products) in Materialtests eine Kraft von ca. 0,17 MPa auf [Cha et al., 2009]. Dementsprechend besitzen Protein-basierte Bindemittel ein großes Potenzial für die Nutzung in den Materialwissenschaften. Auch die Vielzahl an Möglichkeiten im Protein-Design, die in den Kapiteln 1.1 (S. 4) und 1.2 (S. 6) vorgestellt wurden, erlaubt ein breites Feld für die Erforschung Protein-basierter Bindemittel mit neuen und einzigartigen Eigenschaften.

## 1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines bio-basierten Bindemittels auf Proteinbasis. Basierend auf dem allgemeinen Prinzip eines guten Klebstoffs sollte für das Design eine Kombination von adhäsiven und kohäsiven Proteinsequenzen zur Erzielung bester

Bindungseigenschaften an Sand, bestehend aus  $\text{SiO}_2$ , verwendet werden. Dafür sollte nach intensiver Literaturrecherche natürlicher als auch *de novo* designer Sequenzen eine Proteinbibliothek erstellt werden. Diese Bibliothek sollte im adhäsiven Anteil Proteinsequenzen enthalten, die Tyrosine zur späteren Modifikation zu DOPA enthalten, wie z.B. Muschelfußproteine. Als kohäsiver Protein-Block sollten thermoresponsive Elastin-ähnliche-Sequenzen in die artifiziellen Proteine eingebaut werden.

Nach dem Protein-Design sollte die rekombinante Produktion der Proteine zunächst im Schüttelkolbenmaßstab in verschiedenen *E. coli* Stämmen untersucht werden. Da es sich bei den geplanten Designer-Proteinen um künstliche, nicht-natürlich vorkommende Proteine handelt, stellte die rekombinante Herstellung eine besondere Herausforderung für die vorliegende Arbeit dar. Nach erfolgreicher Etablierung, Anpassung und Optimierung der Kultivierungsbedingungen zur Steigerung der Produktion der Designer-Proteine, war die Übertragung des Prozesses in einen Bioreaktor zur Gewinnung ausreichender Mengen an Biomasse ein weiterer Aspekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Im Anschluss sollten die rekombinanten Proteine unter Verwendung geeigneter Reinigungsmethoden effizient aus *E. coli* isoliert werden. Für die spezifische Bindung an hydrophile  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen sollte eine Funktionalisierung der Proteine durch Hydroxylierung der Peptidgebundenen Tyrosine zu DOPA mit Hilfe einer rekombinant produzierten Tyrosinase untersucht werden. Der Erfolg der Modifikation sollte sowohl qualitativ als auch quantitativ bestimmt werden.

Abschließend sollten diese rekombinant hergestellten Zielproteine materialwissenschaftlich untersucht werden. Dazu sollten die Bindungseigenschaften der Proteinadsorption sowie die Zug-Scher-Kräfte der artifiziellen Proteine gemessen werden, um die beste und vielversprechendste Variante zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Sämtliche verwendete Chemikalien sind in der Tabelle 2-1 zusammengestellt.

**Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien**

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Aceton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9372	≥ 99 %
Acetonitril	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8825	HPLC Gradient Grade
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 % Lösung)	AppliChem GmbH Darm- stadt, Deutschland	A3574	k. A.
Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co,	5210	k. A.
Agarose	VWR, Radnor, USA	9012-36-6	k. A.
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.12018.0025	≥ 98 %
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	K298	≥ 99 %
Ammoniumhydrogencitrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P735	≥ 98 %
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9592	≥ 98 %
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3746	≥ 99 %
BCIP/NBT	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	SLBH1944V	k.A.
Benzonase (25 U/μL)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.01695.0001	≥ 99 %
Bromphenolblau (Na-Salz)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	A512	k. A.
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	5239	≥ 99 %
Coomassie-Brillantblau G250	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9598	k. A.
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3886	98,5 %
Ethylendiamintetraessig- säure (Dinatrium-Salz) (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8043	≥ 99 %
Eisen(III)-Chlorid- Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	1.03943.0250	k. A.
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3738	≥ 99 %
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	K928	≥ 99 %
(D)-Glucose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	X997	k. A.
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3783	≥ 99 %
Glycin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3908	≥ 99 %
Harnstoff	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3941.2	≥ 99,5 %
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	2363	k. A.

Bezeichnung	Lieferant	Best. Nr.	Reinheit
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	CN08	k. A.
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	9866.1	$\geq 99,5 \%$
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6781.1	$\geq 99,5 \%$
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P749	$\geq 99 \%$
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P7493	$\geq 99 \%$
Kanamycinsulfat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T832	k. A.
Kupfer(II)-Chlorid-Dihydrat	Fluka Chemika	61174	k. A.
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8259	k. A.
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	8147330100	$\geq 99 \%$
MagnesiumsulfatHeptahydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	P027	$\geq 99 \%$
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland	28625.02	k. A.
Methanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	7342	HPLC Gradient Grade
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6773	$\geq 99 \%$
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	71289	$\geq 99,5 \%$
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	3957	$\geq 99 \%$
Natriumdodecylsulfat (SDS, Rotistock 20%)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	1057	k. A.
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4984	$\geq 99 \%$
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6771	$\geq 99 \%$
2-Propanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	T910	UV/IR Grade
ortho-Phosphorsäure (85 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	6366	k. A.
L-Rhamnose	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4655.2	$\geq 98 \%$
Salzsäure (37 %)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4625	k. A.
Struktol J673	Schill + Seilacher	18412	k. A.
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	2367	k. A.
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4855	$\geq 99 \%$
Trypton/Pepton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	8952	k. A.
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	4859	k. A.
Tyrosin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland	1741	$\geq 99 \%$
Tyrosinase	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	T3824	$\geq 1000 \text{ U/mg}$

## 2.1.2 Stammlösungen

Sämtliche verwendeten Stammlösungen sind in Tabelle 2-2 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Stammlösungen**

Stammlösung	Lösungsmittel	Konzentration
Ampicillin	dH <sub>2</sub> O	100 g/L
Chloramphenicol	Ethanol (96 %)	33 g/L
EDTA	10 mM TRIS, pH 8,0	100 mM
Ethidiumbromid	dH <sub>2</sub> O	1 g/L
IPTG	dH <sub>2</sub> O	0,5 mM
Kanamycin	dH <sub>2</sub> O	30 g/L
MgCl <sub>2</sub>	dH <sub>2</sub> O	1 M
PMSF	Isopropanol	100 mM
L-Rhamnose	dH <sub>2</sub> O	1 M

## 2.1.3 Puffer und Medien

Allgemein verwendete Puffer und Medien sind in Tabelle 2-3 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien**

Bezeichnung	Zusammensetzung	pH
Coomassie-Färbelösung	1,2 mM Coomassie Brilliantblau G-250 4,23 mM Isopropanol 1,6 mM Eisessig	
Entfärbelösung	4,02 mM Isopropanol 1,6 mM Eisessig	
Laemmli-Puffer [Laemmli, 1970]	0,25 mM Tris 1,9 M Glycin 34,7 mM SDS	
<i>Lysogeny broth</i> (LB)-Medium	10 g/L Trypton/Pepton 10 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt	7,0
Probenpuffer für SDS-PAGE	0,22 mM Tris 17,3 mM SDS 7,46 µM Bromphenolblau 540 mM Glycerin 100 mM β-Mercaptoethanol	6,8
Phosphatpuffer für TB-Medium (1:10 mit TB-Medium)	0,17 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,72 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 13,9 mM SDS	6,8
TAE-Puffer (10x)	0,4 M Tris 0,2 M Essigsäure 10 mM EDTA	8,5
<i>Terrific broth</i> (TB)-Medium	12 g/L Trypton/Pepton 24 g/L Hefeextrakt 0,5 % (m/v) Glycerin	-
Trenngelpuffer	1,5 M Tris 13,9 mM SDS	8,8

## 2.1.4 Enzyme und Kits für die Molekularbiologie

Sämtliche verwendeten Kits sind in Tabelle 2-4 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Enzyme, Reagenzien und Kits**

Bezeichnung	Lieferant	Best.Nr.
DNA Loading Dye	ThermoFischer Scientific	R0611
dNTPs	ThermoFischer Scientific	R0181
FastAP	ThermoFischer Scientific	EF0654
<i>Bsal</i>	ThermoFischer Scientific	ER0292
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	ThermoFischer Scientific	K0502
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas	SM0311
Massruler Loading Dye	Fermentas	R0621
MSB Spin PCRapace	Stratec	1020220300
<i>NcoI</i>	ThermoFischer Scientific	ER0571
<i>NheI</i>	ThermoFischer Scientific	ER0971
Phusion Polymerase	ThermoFischer Scientific	F530S
Puffer G (10x)	ThermoFischer Scientific	BG5
Tango Puffer (10x)	ThermoFischer Scientific	BY5
Taq Polymerase	ThermoFischer Scientific	EP0701
T4 DNA Ligase	ThermoFischer Scientific	EL0011

## 2.1.5 Genkonstrukte und Plasmide

Sämtliche verwendete Genkonstrukte sind in der Tabelle 2-5 zusammengestellt.

**Tabelle 2-5: Übersicht über die verwendeten Genkonstrukte**

Protein	Translationsprodukt	Expressionsplasmid	Resistenz	Plasmid <i>backbone</i>	Größe (bp)
Mefp-3	His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp3	pET28_Mefp-3_SD	Kan <sup>R</sup>	pET28a	5809
Mgfp-3	His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp3	pET28_Mgfp-3_SD	Kan <sup>R</sup>	pET28a	5746
DP1A	His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp3-ELP-Mefp3	pJOE_DP1A	Amp <sup>R</sup>	pJOE5751.1	5384
DP1B	His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp3-ELP-Mgfp3	pJOE_DP1B	Amp <sup>R</sup>	pJOE5751.1	5369
DP2	TE-Mefp3-c-myc	pET28_DP2	Kan <sup>R</sup>	pET28a_cer	7818
mTyr	His <sub>6</sub> -mTyr	pET28_mTyr	Kan <sup>R</sup>	pET28a	6226

Die Sequenzen befinden sich im erweiterten Anhang (Kapitel 11, S. 204ff.).

## 2.1.6 Marker und Antikörper

Sämtliche verwendeten Marker und Antikörper sind in der Tabelle 2-6 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tabelle 2-6: Übersicht über die verwendeten Marker und Antikörper**

Bezeichnung	Name	Hersteller
primärer Antikörper	anti-poly-His aus Maus	Thermo Scientific
sekundärer Antikörper	anti-Maus IgG AP aus Ziege	Sigma Aldrich
DNA Marker	GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific

Proteinmarker	Pierce™ Unstained Protein MW Marker	Thermo Scientific
vorgefärbter Proteinmarker	PageRuler Prestained	Thermo Scientific

## 2.1.7 Bakterielle Stämme

Sämtliche verwendeten bakteriellen Stämme sind in der Tabelle 2-7 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

**Tabelle 2-7: Übersicht über die verwendeten bakteriellen Stämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS	F <sup>-</sup> ompT hsdSB(r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) gal dcm λ(DE3) pLysS (Cm <sup>R</sup> )	[Studier und Moffatt, 1986]
<i>Escherichia coli</i> BW3110	W3110 rhaB <sup>-</sup>	[Stumpp et al., 2000; Wilms et al., 2001]
<i>Escherichia coli</i> DH5α	φ80lacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169	[BRL, 1986]
<i>Escherichia coli</i> KRX	F <sup>'</sup> , traD36, ΔompP, proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> , lacIq, Δ(lacZ)M15, ΔompT, endA1, recA1, gyrA96 (Nal <sup>r</sup> ), thi-1, hsdR17 (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), e14 <sup>-</sup> (McrA <sup>-</sup> ), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), Δ(rhaBAD)::T7 RNA polymerase	[Falbe, 1997; Mizuguchi et al., 2017]

### 2.1.7.1 *Escherichia coli* BW3110

Die Designer-Proteine 1A und 1B wurden in das Plasmid pJOE5751.1 kloniert. Dieser Expressionsvektor ist durch ein positiv reguliertes Expressionssystem gekennzeichnet, welches mit L-Rhamnose induziert wird [Stumpp et al., 2000]. Die heterologe Produktion erfolgte dementsprechend in dem Rhamnoseabbau-defizienten Stamm *E. coli* BW3110 [Wegerer et al., 2008; Wilms et al., 2001]. Dieser Stamm enthält eine Mutation des rhaB-Gens (L-Rhamnulose-Kinase) und weist einen stark reduzierten Rhamnosestoffwechsel auf. Aufgrund der Inaktivierung von rhaB ist *E. coli* BW3110 für Hochzelldichtefermentationen optimiert, da die für den Prozess erforderliche Menge an Rhamnose geringer ist und der Zucker nicht verwertet werden kann.

### 2.1.7.2 *Escherichia coli* KRX

*E. coli* KRX enthält eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, die von einem Rhamnose-Promotor (rhaBAD) positiv reguliert wird [Falbe, 1997]. Die Gene kodierend für die Zielproteine unterliegen dem negativ regulierten T7/lac-Promotorsystem. Dieses unabhängig regulierte Promotorsystem ermöglicht die Reduktion einer basalen Genexpression, welche häufig in *E. coli* BL21 (DE3)-Stämmen auftritt [Hartnett et al., 2006]. Diese Eigenschaft erleichtert die Klonierung und Expression von Proteinen, die für *E. coli* toxisch sein könnten.

## 2.1.8 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Sämtliche verwendeten Geräte sind in der Tabelle 2-8 in alphabetischer Reihenfolge zusammengestellt.

Tabelle 2-8: Übersicht über die verwendeten Geräte

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Agarosegelapparatur	H&E 33 Mini Horizontal Submarine Unit	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator	H&P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Autoklav	Systemec VE-150	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
Blot-Apparatur	V10-SDB	biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
Chromatografieanlage	Äkta pure	GE Healthcare, Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatografiesäulen	XK 16/20, XK 26/20,	GE Healthcare, Biosciences, Uppsala, Schweden
Chromatografie-säulenmaterial	Ni-Sepharose Excel	GE Healthcare, Biosciences, Uppsala, Schweden
Dialyseschlauch	Spectra/Por® 7 Dialysis Membrane, Pre-heated RC tubing, MWCO: 3,5 kDa, 15 kDa & 25 kDa	Spectrum Labs, Breda, Niederlande
Elektrophoresestromversorgung	EPS 301	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Feinwaage	BP 221S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefriertrockner	Lyovac GT 2-E	Steris, Mentor, USA
Gasbrenner	Fuego basic	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Geldokumentation	GenGenius Syngene	VWR, Darmstadt, Deutschland
Glucose-Analysator	YSI2700 Select	YSI Life Sciences, Tunbridge Wells, UK
Glycerol Assay Kit	K-GCROL	Megazyme, Wicklow, Irland
Hochdruckhomo-genisator	APV2000	SPX Flow Technology Rosista GmbH, Unna, Germany
Kanülen	Sterican®	B   Braun, Melsungen, Deutschland
Kapillaren (Prometheus NT.48)	Series nanoDSF Grade Standard Capillaries	NanoTemper Technologies GmbH, München, Deutschland
Küvetten	105.202-QS	Hellma Analytics, Mühlheim, Deutschland
Magnetrührer	Rotilabo® Magnetstäbchen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Membranfilter	Amicon® Ultra centrifugal filters, 10 kDa	Merck, Darmstadt, Deutschland
Micapplatten	V5 Qualität, 25x75mm, Dicke: 0,26-0,31mm	Science Services GmbH, München, Deutschland
Mikrowelle	Solo Inverter, NN-SD452W	Panasonic, Osaka, Japan
NanoDrop (Photometer)	One <sup>C</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
One Shot (Zellaufschluss)	OS Model	Constant Systems Limited, Daventry Northants, England
pH-Meter	Fe20/EL20	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Photometer	Genesys 6 10S	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Photometer	Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Pipetten	1-10 µl 2-20 µl 10-100 µl 100-1.000 µl 500-5.000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Accu-Jet® Pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Prometheus	NT.48	NanoTemper Technologies GmbH, München, Germany
Prüfmaschine	Proline Z020	Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland
QCM-D	q.CeIT	3T GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Rollenmischer	SRT1	Bibby Scientific Ltd, Staffordshire, UK
Rührplatte	Mono Power direct Mobil	Variomag, Daytona Beach, USA
SDS-PAGE Anlage und Zubehör	EPS 301	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Schüttler	IKA KS4000i control	IKA Werke GmbH, Staufen, Deutschland
Schüttelinkubator	Innova 4230,	New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA
	Multitron,	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
	IKA®-KS4000, Control	IKA, Staufen, Deutschland
Spritzen	Inject® / -F	B   Braun, Melsungen, Deutschland
	Omnifix®	
Sterilfilter	0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Sterilwerkbank	Nu-440-400	NuAire Inc., Plymouth, USA
Thermoblock	Thermostat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thermocycler	T personal 48, T professional Basic Gradient	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermoschüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super 10 P	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Ultra-Turrax	Miccra R-T D-1	ART moderne Labortechnik, Mühlheim, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuubrand PC 511	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie® 2, RS-VA 10	Scientific Industries, New York, USA
	440-35N,	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
Waage	EA 15DCE-I,	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
	BP221S,	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
	APX-153	Denver Instrument, Göttingen, Deutschland
Wärmeschrank	KP 196	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Wipptisch	60281-00	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Wasserbad	Haake, DC10	PSL Systemtechnik GmbH, Osterode, Deutschland
	UC-5B	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	5415 R, 5810 R, Sorvall, LYNX 6000,	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland Thermo Scientific, Massachusetts, USA

Bezeichnung	Typ	Hersteller (Name, Ort, Land)
Zentrifuge	Mikro 220R	Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
	Rotilabo® Mini-Zentrifuge	Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Avanti J-30i, Rotor JA-10,	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	Rotor JA 30.50	

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 *In silico* Recherche

Zu Beginn erfolgte eine umfassende Online-Recherche zur Auswahl geeigneter Proteinsequenzen basierend auf dem allgemeinen Prinzip eines guten Klebstoffs (Kap. 1, S. 1 und Kap. 1.3, S. 9). Die zur *in silico* Recherche verwendeten Online *tools* sind in Tabelle 2-9 aufgelistet. Die Literaturrecherche wurde mittels der wissenschaftlichen Online-Literaturdatenbanken Google-Scholar, SciFinder® und Web of Science durchgeführt. Neben der klassischen Literaturrecherche wurden die finalen Proteinsequenzen auf potenzielle Proteaseschnittstellen in der Aminosäuresequenz (MEROPS Datenbank, *Peptide Mapper*) geprüft. Zur Produktion in den Mikroorganismen wurde eine Codon-*usage* Optimierung durchgeführt und die daraus resultierende Sequenz auf das Vorhandensein seltener Codons im geplanten Wirtstamm geprüft. In diesem Zusammenhang wurde auf Restriktionsschnittstellen in den Nucleotidsequenzen (*Restriction Mapper*) geprüft, um die entsprechende Klonierung in eigenen Experimenten oder durch entsprechende Dienstleister während der Generierung der Expressionsplasmide optimal vorzubereiten.

Die Entwicklung einer Wirtsplattform und die rationale Wahl des Wirts unter Berücksichtigung der Codon-*usage*, der Literaturdaten sowie der eigenen experimentellen Erfahrung sollte eine effiziente Produktion ermöglichen. Die finale Bewertung der Proteinsequenzen erfolgte nach den folgenden sechs Kriterien: (I) rekombinante Produktion, (II) Fusionen (relevant im Hinblick auf die Materialeigenschaften oder für die Proteinaufarbeitung), (III) Material- und/oder Bindeeigenschaften, (IV) Komplexität, (V) Neuheitswert und (VI) interne Risikobewertung. Das Ergebnis der *in silico* Recherche war die Basis für ein Baukastensystem bestehend aus unterschiedlichen Protein-Blöcken (Kap.1.3, S. 9). In Tabelle 2-9 sind die Prüfparameter der *in silico* Recherche mit den verwendeten Online *tools* dargestellt.

**Tabelle 2-9 Prüfparameter der *in silico* Recherche**

Prüfparameter	Beschreibung	Online <i>tool</i>	Website
Funktionsbasierte Proteinsequenzen	Literaturrecherche zur Auswahl geeigneter Proteinsequenzen	Google-Scholar, SciFinder®, Web of Science	<a href="https://scholar.google.de/">scholar.google.de/</a> <a href="https://scifinder.cas.org">https://scifinder.cas.org</a> <a href="https://apps.webofknowledge.com/">https://apps.webofknowledge.com/</a>
Restriktionsschnittstellen	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen anhand der Nucleotidsequenz	Restriction Mapper	<a href="http://www.restrictionmapper.org/">http://www.restrictionmapper.org/</a>
Potenzielle Proteaseschnittstellen	Ermittlung von proteolytischen Schnittstellen anhand der Aminosäuresequenz/Primärstruktur der Proteine	MEROPS Datenbank, Peptide Mapper	<a href="https://www.ebi.ac.uk/merops/">https://www.ebi.ac.uk/merops/</a> <a href="https://web.expasy.org/peptide_cutter">https://web.expasy.org/peptide_cutter</a>
Codon- <i>usage</i>	Codon- <i>usage</i> Optimierung der Gensequenzen für Wirtorganismus	GeneArt	<a href="http://www.thermofisher.com/geneart">www.thermofisher.com/geneart</a>

Ermittlung und Bewertung von seltenen Codons, die durch Optimierung eingebaut wurden	RareCodon Analyzer, Rare Codon Calculator	<a href="http://www.biologicscorp.com/tools/Rare-Codon-Analyzer">www.biologicscorp.com/tools/Rare-Codon-Analyzer</a> <a href="http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html">http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html</a>
--	--	---

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Gensynthese

Die DNA-Sequenzen der verschiedenen Designer-Proteine sowie der mikrobiellen Tyrosinase sind im Anhang dargestellt (Abschnitt 11, S. 204ff.). Die Synthese der Gensequenzen und das Klonieren in die entsprechenden Expressionsvektoren (pJOE\_DP1A, pJOE\_DP1B, pET28\_DP2 und pET28\_mTyr) wurde durch die Dienstleister Thermo Fisher Scientific und Eurofins Genomics durchgeführt. Die Vektorkarten der Plasmide aller Designer-Konstrukte sind ebenfalls im Anhang zu finden.

### 2.2.2.2 Klonierung der Expressionsplasmide für die Mfp-3-Einzeldomänen

Die Klonierung der Konstrukte pET28a\_Mefp3\_SD und pET28a\_Mgfp3\_SD für die Mfp-3-Einzeldomänen wurden wie folgt beschrieben durchgeführt. Die *templates* pJOE\_DP1A und pJOE\_DP1B für die Generierung der Konstrukte wurde von der Firma Thermo Scientific synthetisiert (Kap. 2.2.2.1). Als Zielvektor diente pET28a(+) (5,37 kb, Kanamycin-Resistenz).

#### 2.2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur spezifischen Amplifikation der Mfp3-Gene wurde eine PCR durchgeführt. Für eine analytische PCR wurde ein Gesamtvolumen von 20 µL, für eine präparative PCR ein Gesamtvolumen von 50 µL gewählt. Für die Amplifizierung des Genabschnittes wurden folgende Oligonukleotide (Synthese durch Invitrogen) genutzt:

*forward-Primer*: 5' – CTG AGG TCT CAC ATG GGC AGC AGC CAT CAT C – 3' (31 nt)

*reverse-Primer*: 5' – CAT GGT CTC ACT AGC TAC CAA TAT TTC CCC CGT C – 3' (34 nt)

Die sequenzspezifische Anlagerung der Primer erfolgte bei 64 °C. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen und erfolgte nach dem unten aufgeführten PCR-Programm:

#### Reaktionsansatz (50 µL):

- 0,5 µL Phusion DNA-Polymerase (0,3 µM)
- 5 µL Polymerase-Puffer (-Mg) (10x)
- 4 µL MgSO<sub>4</sub> (25 mM)
- 1 µL *forward-Primer* (10 pmol/µL)
- 1 µL *reverse-Primer* (10 pmol/µL)
- 5 µL dNTP-Mix (2 mM)
- 1 µL *template* (pJOE\_DP1A oder pJOE\_DP1B) (134,4 ng/µL)
- 32,5 µL H<sub>2</sub>O (ad 50 µL)

#### PCR-Programm:

- |    |               |       |                        |
|----|---------------|-------|------------------------|
| 1) | 5 min         | 99 °C | Initiale Denaturierung |
| 2) | 1 min         | 99 °C | Denaturierung          |
| 3) | 30 sec        | 64 °C | <i>Annealing</i>       |
| 4) | 20 sec        | 72 °C | Elongation             |
|    | 24x 2) bis 4) |       |                        |
| 5) | 5 min         | 72 °C | finale Elongation      |
| 6) | Pause         | 16 °C | Pause                  |

Zur Analyse der PCR wurde der Ansatz mit Probenpuffer (6-fach) versetzt und auf ein 1 %-iges Agarosegel (0,5 µg/mL Ethidiumbromid) aufgetragen (Kap. 2.2.2.6). Nach einer präparativen PCR wurde das PCR-Produkt mit Hilfe eines MSB Spin PCRapace Kit (Strattec) nach Herstellerangaben gereinigt und in 30 µL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.2.2.2.2 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau wurde die jeweilige Endonuklease für einen präparativen Ansatz wie folgt beschrieben eingesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Verdau des PCR-Produktes (20 µL):

- 2 µL Puffer G (10x)
- 1 µL *Bsa*I (10 U/µL)
- 5 µL PCR-Produkt (~ 500 ng)
- 12 µL ddH<sub>2</sub>O (ad 20 µL)

Die Inaktivierung des Restriktionsenzym erfolgte für 20 min bei 75 °C.

Sequentieller Verdau des Zielvektors (30 µL):

- 3 µL Tango Puffer (10x)
- 1 µL *Nco*I (10 U/µL)
- 3 µL pET28a (~ 500 ng)
- 23 µL ddH<sub>2</sub>O (ad 30 µL)

t = 1 h bei 37 °C → Inaktivierung: t = 20 min bei 65 °C

- 1 µL *Nhe*I (10 U/µL)

t = 1 h bei 37 °C, → Inaktivierung: t = 20 min bei 65 °C

Um eine Religation des geschnittenen *Insert* in den Ursprungsvektor pET28a zu vermeiden, wurde eine 5'-Dephosphorylierung mit Hilfe der FastAP (Alkalische Phosphatase) durchgeführt. Es wurden 1 U FastAP eingesetzt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde 10 min bei 75 °C inaktiviert. Im Anschluss erfolgte die Reinigung von PCR-Produkten oder DNA-Fragmenten (>100 bp) nach Herstellerangaben mit dem MSB Spin PCRapace Kit (Strattec). Abweichend vom Herstellerprotokoll erfolgte die Elution mit 20 µL ddH<sub>2</sub>O.

#### 2.2.2.2.3 Ligation

Die Ligation von gereinigten und geschnittenen *Insert* und Zielvektor erfolgte nach dem allgemeinen Pipettierschema (s.u.). Vergleichend wurde ein molekulares Verhältnis *Insert* / Zielvektor von 3:1 und 6:1 gewählt. Die Ligation erfolgte für ca. 16 h bei 16 °C. Die T4 Ligase wurde anschließend für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

allgemeiner Ansatz:

- 3 µL geschnittenes Plasmid
- 0,5 µL / 1 µL geschnittenes *Insert*
- 2,4 µl ATP (25 mM)
- 0,75 µL T4 Ligase
- 1,5 µL T4 Ligase Puffer
- Ad 15 µL ddH<sub>2</sub>O

Jeweils 5 µL der Ligationsansätze wurden zur Transformation von chemokompetenten *E. coli* DH5α Zellen (Kap. 2.2.2.3.1) und 2 µL für elektrokompente *E. coli* BL21 (DE3) Gold pLysS Zellen (Kap. 2.2.2.3.2) eingesetzt. Wie in Kapitel 2.2.2.4 (S. 36) beschrieben, wurde die Plasmid-DNA isoliert.

#### 2.2.2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der isolierten Plasmid-DNA pET28a\_*Mefp*-3\_SD und pET28a\_*Mgfp*-3\_SD (Kap. 2.2.2.4, S. 36) erfolgte mit den spezifischen T7 Primern durch Eurofins Genomics. Dafür

wurden 100 ng/μL Plasmidlösung in 15 μL und je 5 μL mit einer Konzentration von 10 pmol/μL der Primer eingeschickt. Die Analyse der Sequenziererergebnisse erfolgte mit Hilfe des *open source* Programms Clustal Omega (1.2.1) *multiple sequence alignment*.

*T7 forward-Primer*: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG G -3' (19 nt)

*T7 reverse-Primer*: 5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3' (19 nt)

### 2.2.2.3 Transformation von *E. coli*

#### 2.2.2.3.1 Hitzeschock-Methode

Zur Transformation von *E. coli* mit dem jeweiligen Plasmid (Tabelle 2-10) wurden die chemokompetenten *E. coli* Stämme DH5α (Plasmidamplifikation), *E. coli* BW3110 und KRX (Expression) verwendet. Dazu wurden 100 μL der chemokompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und mit ca. 300 – 500 ng Plasmid gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C durchgeführt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 2 min, bevor 800 μL LB-Medium (10 g/L Trypton/Pepton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt; pH 7,0) zugegeben wurden. Der Ansatz wurde für 45 – 60 min bei 37 °C und 650 rpm (Eppendorf Thermomixer) inkubiert. 50 μL der Zellsuspension und ein Teil des resuspendierten Pellets wurden auf einer LB-Platte mit entsprechenden Antibiotikum (Tabelle 2-10) ausgestrichen. Die LB-Platten wurden für ~ 16 h bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 2-10 Übersicht der verwendeten Plasmide in *E. coli* DH5α, BW3110 oder KRX, sowie deren Antibiotikaresistenz und die finale Konzentration im Medium**

Plasmid	Bezeichnung	Resistenz	C <sub>Ab final</sub> (μg/mL)
pET28a_Mefp3_SD	<i>E. coli</i> DH5α, pET28a_Mefp3_SD	Kan <sup>R</sup>	30
pET28a_Mgfp3_SD	<i>E. coli</i> DH5α, pET28a_Mgfp3_SD	Kan <sup>R</sup>	30
pJOE_DP1A	<i>E. coli</i> DH5α, pJOE_DP1A	Amp <sup>R</sup>	100
pJOE_DP1A	<i>E. coli</i> BW3110, pJOE_DP1A	Amp <sup>R</sup>	100
pJOE_DP1B	<i>E. coli</i> DH5α, pJOE_DP1B	Amp <sup>R</sup>	100
pJOE_DP1B	<i>E. coli</i> BW3110, pJOE_DP1B	Amp <sup>R</sup>	100
pET28a_DP2	<i>E. coli</i> DH5α, pET28a_DP2	Kan <sup>R</sup>	30
pET28a_mTyr	<i>E. coli</i> DH5α, pET28a_mTyr	Kan <sup>R</sup>	30
pET28a_mTyr	<i>E. coli</i> KRX, pET28a_mTyr	Kan <sup>R</sup>	30

#### 2.2.2.3.2 Elektroporation

Die Transformation von *E. coli* BL21 (DE3) Gold pLysS mit dem jeweiligen Expressionsvektor erfolgte nach der Standardprozedur für Elektroporation [Sambrook und Russell, 2006]. Die Expressionsstämme sind in Tabelle 2-11 aufgelistet.

**Tabelle 2-11: Übersicht der verwendeten Plasmide in *E. coli* BL21 (DE3) Gold pLysS**

Plasmid	Bezeichnung	Resistenz	C <sub>Ab final</sub> (μg/mL)
pET28a_Mefp3_SD	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS, pET28a_Mefp3_SD	Kan <sup>R</sup> +Cm <sup>R</sup>	30 + 33
pET28a_DP2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS, pET28a_DP2	Kan <sup>R</sup> +Cm <sup>R</sup>	30 + 33
pJOE_DP1A	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS, pJOE_DP1A	Amp <sup>R</sup> +Cm <sup>R</sup>	30 + 33

#### 2.2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus einer *E. coli* Kultur wurden 5 mL LB-Medium (je nach eingesetztem Plasmid Kan<sup>R</sup>, Amp<sup>R</sup> oder Kan<sup>R</sup>+Cm<sup>R</sup>, Tabelle 2-10, S. 35) mit einer entsprechenden *E. coli* Einzelkolonie steril inokuliert und für mind. 16 h bei 37 °C und 180 rpm (Multitron Infors HT) inkubiert. Die Kulturen wurden am Folgetag bei ~ 11000 x g zentrifugiert, der Überstand entfernt und mit dem Zellpellet zur weiteren Bearbeitung nach Herstellerangaben des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific) verfahren. Abweichend vom Herstellerprotokoll erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 30 µL ddH<sub>2</sub>O (60 °C).

#### 2.2.2.5 Quantifizierung von DNA

Durch photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm erfolgte die Quantifizierung der DNA-Konzentration einer Probe (NanoDrop). Zur Beurteilung der Reinheit der Plasmidpräparation wurde ebenfalls die Absorption bei 280 nm bestimmt und das Verhältnis beider Absorptionen ( $A_{260} / A_{280}$ ) überprüft. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 1,9 liegen, um von einer ausreichend aufgereinigten DNA auszugehen [Held, 2001; Manchester, 1996; Wilfinger et al., 1997].

#### 2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Proben wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese genutzt. Dazu wurden 1 %-ige (w/v) Agarosegele mit TAE-Puffer (Tabelle 2-3, S. 27) hergestellt, die mit 20 µL Ethidiumbromid ( $C_{\text{final}} = 0,57 \text{ mg/mL}$ ) versetzt wurden. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit DNA *Loading Dye* gemischt (5 µL Probe + 1 µL 6 × DNA *Loading Dye*) und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 80 V und 400 mA. Die Auswertung und Dokumentation der DNA-Proben wurde mit dem Gel-Dokumentationssystem Syngene GenGenius (VWR, USA) mittels UV-Licht durchgeführt. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Hilfe von GeneSnap (Version 6.03).

### 2.2.3 Heterologe Produktion

#### 2.2.3.1 Kultivierung von *E. coli*-Stämmen

##### 2.2.3.1.1 Schüttelkolbenmaßstab

Alle verwendeten Medienbestandteile zur Kultivierung von *E. coli* Stämmen wurden durch Autoklavieren bei 125 °C für 25 min sterilisiert. Antibiotika und Induktorsubstanzen wurden steril filtriert. Zunächst erfolgten Test-Experimente zur Produktion der rekombinanten Proteine im 20 mL Schüttelkolbenmaßstab (SK, in der gesamten Arbeit wurden Schikanekolben verwendet) in verschiedenen *E. coli* Stämmen, um die besten Induktions- und Produktionsbedingung zu ermitteln. Es wurden verschiedene Kultivierungsparameter verglichen, in denen zunächst die Induktionsdauer (2 – 22 h), Induktionstemperatur (20 – 37 °C) und die Induktorkonzentrationen untersucht wurden. Die final verwendeten Kombinationen für den 500 mL SK-Maßstab sind in Tabelle 2-12 zusammengefasst.

Für die Produktion der Zielproteine wurden 100 mL einer Vorkultur (VK) TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Kolonie inokuliert und für ~ 16 h bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Die Zellkultur wurde für 20 min bei 4 °C und 3800 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem TB-Medium mit Antibiotikum aufgenommen. Anschließend wurde die VK genutzt, um die Hauptkulturen (500 mL in 2 L SK) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 einzustellen

(Inkubation bei 37 °C und 80 rpm). Vor dem Start der Expression wurde die Temperatur auf die jeweilige Induktionstemperatur reduziert. Die Induktion wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 0,8 initiiert und erfolgte für das jeweilige Zielprotein nach den in Tabelle 2-12 aufgelisteten Induktionsbedingungen. Mittels Zentrifugation für 30 min bei 4 °C und 6000 x g wurden die Zellen geerntet. Die gewonnene BFM wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Für die SDS-PAGE-Analyse (Kap. 2.2.4.1, S. 39) von 1/OD<sub>600</sub>-Proben wurde 1 mL Zellsuspension (bei einer Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1,0) entnommen und für 10 min bei 4 °C und ~ 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Das Zellpellet wurde in 100 µL Probenpuffer resuspendiert und für 5 min bei 99 °C inkubiert. Für die SDS-PAGE-Analyse wurden 10 µL der entsprechenden 1/OD<sub>600</sub>-Probe und 5 µL Marker (Thermo Scientific) aufgetragen.

**Tabelle 2-12 Übersicht der verwendeten Plasmide und *E. coli* Stämme und der jeweils verwendeten finalen Induktionsbedingung**

Zielprotein	Plasmid	Re-sistenz	<i>E. coli</i> Stamm	Induktionsbedingungen
His-SUMO-Mefp-3	pET28a_Mefp3_SD	Kan+Cm <sup>R</sup>	BL21 (DE3) Gold pLysS	1 mM IPTG, 30 °C, 20 h
His-SUMO-Mgfp-3	pET28a_Mgfp3_SD	Kan+Cm <sup>R</sup>	BL21 (DE3) Gold pLysS	1 mM IPTG, 30 °C, 20 h
DP1A	pJOE_DP1A	Amp <sup>R</sup>	BW3110	5 mM Rhamnose, 25 °C, 22 h
DP1B	pJOE_DP1B	Amp <sup>R</sup>	BW3110	5 mM Rhamnose, 25 °C, 22 h
DP2	pET28a_DP2	Kan+Cm <sup>R</sup>	BL21 (DE3) Gold pLysS	1 mM IPTG, 37 °C, 2 h
His <sub>6</sub> -mTyr	pET28a_mTyr	Kan <sup>R</sup>	KRX	5 mM L-Rhamnose + 1 mM IPTG, 30 °C, 21 h

### 2.2.3.1.2 Bioreaktormaßstab

Zur Bereitstellung von ausreichenden Mengen an Designer-Proteinen erfolgte eine Erhöhung des Kultivierungsmaßstabs von 0,5 L (SK) auf 7,5 bzw. 15 L. Zu diesem Zweck wurde die Kultivierung auf einen Bioreaktor (BIOSTAT<sup>®</sup> C, Sartorius) in Fed-Batch-Fermentation übertragen. Die Fermentation erfolgte zunächst im *batch*-Modus mit 5 g/L Glucose und einer anschließenden kontinuierlichen Zugabe (100 – 140 g/L) einer *feed*-Lösung aus 150 g/L Hefeextrakt und 250 mL/L Glycerin. Die Regelgrößen während der Fermentation waren die Temperatur, die Sauerstoffsättigung, der pH-Wert sowie die Schaumbildung. Die Regulierung des pH-Wertes auf 7,0 während der Fermentation erfolgte mittels 10 %-iger Natronlauge oder 20 %-iger Phosphorsäure. Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch Anpassung der Rührerdrehzahl konstant auf pO<sub>2</sub> = 5 L/min gehalten. Als Antischaummittel diente 20 %-iges STRUKTOL J673.

Die Kultivierung erfolgte dreistufig in LB-Medium (10 g/L Trypton/Pepton, 10 g/L NaCl, 5 g/L Hefeextrakt; pH 7,0) mit dem entsprechenden Antibiotikum unter folgenden Bedingungen: I – 2 x 20 mL, LB-Medium, ~ 16 h, 37 °C und 130 rpm; II – 2 x 100 mL LB-Medium, ~ 16 h, 37 °C und 100 rpm; III – 6 x 500 mL LB-Medium, ~ 16 h, 30 °C und 80 rpm. Die Start-OD<sub>600</sub> aller Vorkulturen (VK) betrug jeweils 0,1. Die dritte VK diente als Inokulum (3 L des jeweiligen *E. coli* Stammes mit entsprechenden Expressionsplasmid, siehe Tabelle 2-13) für die Fermentation im 7,5 bzw. 15 L Maßstab.

Für das Anfangsvolumen an TB-Medium wurden 0,5 g/L Ammoniumchlorid, 35 g/L Hefeextrakt in 5 L dH<sub>2</sub>O gelöst und im Fermenter auf 7,5 bzw. 15 L dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Sterilisation fand *in situ* statt. Die *batch*-Glucose und die *feed*-Lösung wurden separat autoklaviert. Vor

Inokulation erfolgte der Ausgleich des Kondensatverlustes (Gl. 2-1) im Fermenter mit sterilem dH<sub>2</sub>O, die Zugabe der *batch*-Glucose und des jeweiligen Antibiotikums, 0,5 g/L Magnesiumsulfat, 11 g/L di-Kaliumhydrogenphosphat sowie das Einstellen des pH-Wertes auf 7,0.

$$x = V_{\text{Start}} - (V_{\text{Steri}} - V_{\text{Verlust}} + V_{\text{Inokulum}} + V_{\text{Batch-Glc}} + V_{\text{Antibiotikum}} + V_{\text{MgSO}_4} + V_{\text{K}_2\text{HPO}_4}) \quad (\text{Gl. 2-1})$$

Das Wachstum erfolgte bei 37 °C. Der Glucoseverbrauch wurde in regelmäßigen Abständen *off-line* am Glucose-Analysator (YSI2700 Select, YSI Life Sciences) verfolgt. Nach vollständigem Glucoseverbrauch wurde die kontinuierliche Zufütterung mit 140 g/h *feed*-Lösung gestartet. Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 35 wurde die Temperatur auf 25 °C abgesenkt und der *feed* auf 100 g/h reduziert. Nach Erreichen der Temperatur (~ 30 min) erfolgte die Induktion mit dem jeweiligen Induktor (Tabelle 2-13) für 17 h bei 25 °C. Zur Wachstumskontrolle wurde die OD<sub>600</sub> in regelmäßigen Abständen gemessen (*off-line*). Das Anlegen von 1/OD<sub>600</sub>-Proben (Kap. 2.2.3.1.1, S. 36) für die Untersuchung zur Zielproteinbildung mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1, S. 39) erfolgte direkt vor der Induktion und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion sowie zur Zellernte. Die jeweiligen Zellen wurden nach 24 h durch Zentrifugation (6000 g, 30 min, 4 °C) geerntet und bei - 20 °C gelagert.

**Tabelle 2-13 Übersicht der verwendeten *E. coli* Stämme mit dem jeweiligen Expressionsplasmid im Bioreaktormaßstab**

Zielprotein	Plasmid	Resistenz	<i>E. coli</i> Stamm	C Induktor final
His-SUMO-Mefp-3	pET28a_Mefp3_SD	Kan+Cm <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS	1 mM IPTG
His-SUMO-Mgfp-3	pET28a_Mgfp3_SD	Kan+Cm <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS	1 mM IPTG
DP1A	pJOE_DP1A	Amp <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> BW3110	5 mM Rhamnose
DP1B	pJOE_DP1B	Amp <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> BW3110	5 mM Rhamnose
DP2	pET28a_DP2	Kan+Cm <sup>R</sup>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS	1 mM IPTG

### 2.2.3.2 Zellaufschluss

Zum Zellaufschluss wurden für die verschiedene Designer-Proteine unterschiedliche Resuspensionspuffer verwendet (Tabelle 2-14).

**Tabelle 2-14 Übersicht der verwendeten Resuspensionspuffer**

Zielprotein	Plasmid	<i>E. coli</i> Stamm	Resuspensionspuffer
His-SUMO-Mefp-3	pET28a_Mefp3_SD	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF (pH 8,0)*
His-SUMO-Mgfp-3	pET28a_Mgfp3_SD	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF (pH 8,0)*
DP1A	pJOE_DP1A	<i>E. coli</i> BW3110	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl, 500 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA; pH 8,0
DP1B	pJOE_DP1B	<i>E. coli</i> BW3110	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl, 500 mM KCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA; pH 8,0
DP2	pET28a_DP2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS	10 mM NH <sub>4</sub> -acetat (pH 6,7)*
His <sub>6</sub> -mTyr	pET28a_mTyr	<i>E. coli</i> KRX	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 500 mM NaCl (pH 7,5)*

\* Zugabe von 10 U/mL Benzonase und 5 mM MgCl<sub>2</sub> vor mechanischem Zellaufschluss

#### 2.2.3.2.1 Mechanischer Zellaufschluss

Für kleinere Ansätze (≤ 8 g BFM) und zur ersten Überprüfung der Löslich-Unlöslichverteilung der Designer-Proteine wurden die Zellen mittels OneShot bei 1380 bar aufgeschlossen. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator (HDH) über drei Passagen bei ca. 1000 bar und 4 °C. Etwa 200 g der jeweiligen *E. coli* BFM wurde in 400 mL

Resuspensionspuffer (Tabelle 2-14) aufgenommen. Zur Abtrennung der löslichen Fraktion wurde das Zellysate zentrifugiert (Rotor JA 10, 17700 x g, 30 min, 4 °C). Die Proteinkonzentration des Rohextraktes (RE) wurde nach Bradford (Kap. 2.2.6.1.1) bestimmt [Bradford, 1976]. Anschließend wurde das Pellet in einem Volumen Resuspensionspuffer aufgenommen, dass dem Zellsuspensions-Volumen vor Zentrifugation entsprach. Dieser Schritt diente dazu die Löslich-Unlöslichverteilung der rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1) zu analysieren. Für die SDS-PAGE wurden Proben des RE und Pellets jeweils im Verhältnis 1:1 in SDS-PAGE-Probenpuffer angelegt und 5 min bei 99 °C inkubiert. Die Beladung der SDS-PA-Gele erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit jeweils 10 µL.

#### 2.2.3.2.2 Enzymatischer Zellaufschluss

Für die Aufarbeitung der Designer-Proteine DP1A und DP1B erfolgte der Zellaufschluss enzymatisch mittels Lysozym. Dazu wurden 500 g der tiefgefrorenen Fermentationsbiomasse *E. coli* BW3110 (Kap. 2.2.3.1.2) in 1,5 L Resuspensionspuffer (Tabelle 2-14) aufgenommen final mit 0,5 mg/mL Lysozym versetzt. Der Ansatz wurde für ~ 16 h bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Anschließend erfolgte ein Nukleaseverdau für 1 h bei 4 °C durch die Zugabe von final 10 U/mL Benzonase und 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Zur Abtrennung der löslichen Fraktion wurde die Zellsuspension zentrifugiert (Rotor JA 10, 17700 x g, 30 min, 4 °C). Die Proteinkonzentration des RE wurde mittels BCA-Assay (Kap. 2.2.6.1.2) bestimmt. Anschließend wurde das Zellpellet in einem Volumen Resuspensions-Puffer aufgenommen, dass dem Zellsuspensions-Volumen vor Zentrifugation entsprach. Dieser Schritt diente dazu die Löslich-Unlöslichverteilung der rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1) zu analysieren. Der RE wurde zur Reinigung von DP1A mittels *Inverse Transition Cycling* (ITC) verwendet (Kap. 2.2.5.2).

## 2.2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.2.4.1 SDS-PAGE

Die erforderlichen Lösungen und Puffer zur Herstellung der SDS-PA-Gele sind in Tabelle 2-15 aufgelistet. Die Zusammensetzung aller verwendeten Reagenzien ist Tabelle 2-3 zu entnehmen (S. 27). Die Gelpuffer wurden mit HCl auf pH 8,8 bzw. pH 6,8 eingestellt.

Zu trennende Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und 5 – 10 min bei 99 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte 2-stufig in Laemmli-Puffer: In der ersten Stufe 6 min bei 80 mA und 300 V und in der zweiten Stufe 40 min bei 60 mA und 300 V.

Im Anschluss wurde das Gel in Färbelösung für 1 h auf dem Wipptisch inkubiert. Nach der Färbung wurde das Gel mit dH<sub>2</sub>O gespült und mit Entfärbelösung bis zum ausreichenden Kontrast zwischen Hintergrund und Proteinbanden entfärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt.

**Tabelle 2-15: Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele nach [Laemmli, 1970]**

Substanz	2 Trenngele 12,5 %	2 Sammelgele 4,5 %
Gelpuffer	2,5 ml	1,25 ml
Acrylamid/ Bisacrylamid (30%)	4,2 ml	0,75 ml
deionisiertes Wasser	3,3 ml	3,0 ml
TEMED	10 µl	10 µl
gesättigtes APS	20 µl	8 µl

### 2.2.4.2 Western-Blot

Zur Western-Blot-Analyse wurden SDS-PA-Gele eingesetzt, die nach Abschnitt 2.2.4.1 angefertigt wurden. Es wurde ein vorgefärbter Molmassenstandard (PPL Marker, Thermo Scientific) verwendet, um den Erfolg des Transfer-Verfahrens zu überprüfen.

Die verwendete Nitrozellulosemembran und das Whatman-Filterpapier wurden 15 min in Transfer-Puffer (20 % (v/v) MeOH, 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS) auf dem Wipptisch äquilibriert. Das *Blotten* erfolgte bei 250 mA bei 20 V für 1 h. Im Anschluss wurden das Whatman-Filterpapier und das SDS-PA-Gel entfernt. Alle weiteren Schritte wurden (wenn nicht anders angegeben) auf dem Wipptisch durchgeführt. Die Nitrozellulosemembran wurde nacheinander zweimal mit je 15 mL TBS (10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 150 mM NaCl) für 10 min gewaschen, 1 h in 10 mL Blocklösung (3 % BSA (w/v) in TBS) inkubiert, zweimal mit je 15 mL TBS-TT (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05 % (v/v) TWEEN®-20 und 0,2 % (v/v) Triton X-100) und einmal mit 15 mL TBS für 10 min gewaschen. Es folgte die Bindung des primären Antikörpers (Poly-anti-His Antikörper, 1:3000 in 10 mL Blocklösung) für 1 h. Nach zweimaligem Waschen mit je 15 mL TBS-TT und einmal 15 mL TBS für je 10 min wurde die Nitrozellulosemembran mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase, 1:10000 in 10 mL Blocklösung) 1 h inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde zweimal mit je 15 mL TBS-TT 10 min gewaschen. Die Anfärbung des Protein-Antikörper-Komplexes erfolgte durch Zugabe von 10 mL alkalischer Phosphatase-Substratlösung (eine BCIP/NBT- Substratlösung, Serva) für ~2 min ohne Schwenken. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit je 20 mL dH<sub>2</sub>O gestoppt und die Nitrozellulosemembran zum Digitalisieren eingescannt.

## 2.2.5 Reinigung der Proteine

### 2.2.5.1 Chromatografische Proteinreinigung

Die Aufarbeitungen der rekombinanten Proteine His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3, His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3, DP1A, DP1B und His<sub>6</sub>-mTyr erfolgten mittels Affinitätschromatografie über den N-terminalen His<sub>6</sub>-tag. Die Chromatografieläufe wurden mit dem System ÄKTA pure der Firma GE-Healthcare (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Datenaufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Unicorn 7.0. Alle eingesetzten Puffer bzw. Lösungen wurden filtriert (Porendurchmesser = 0,2 µm) und entgast (Ultraschallbad). Die Lagerung der IMAC-Säulen erfolgte in 20 % EtOH. Zur Entfernung des EtOH wurden die Säulen vor Beladung mit mind. 3 CV ddH<sub>2</sub>O gespült und im Anschluss mit 5 CV Puffer A äquilibriert. Die in der vorgelegten Arbeit durchgeführten Chromatografieläufe erfolgten bei Raumtemperatur.

#### 2.2.5.1.1 Reinigung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3

Für die Aufarbeitung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 wurden 200 g der eingefrorenen *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Biomasse in 400 mL Resuspensionspuffer (Tabelle 2-14, S. 38) aufgenommen und aufgetaut. Die Zellen wurden mittels Homogenisator (Ultra-Turrax®) resuspendiert und mittels HDH (Kap. 2.2.3.2.1, S. 38) aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (17700 x g, 30 min, 4 °C) wurde der RE auf eine Ni(II)-Sephrose-Excel-Säule (XK 26/20, CV = 39,3 mL) aufgetragen.

Die Beladung der Säule erfolgte über die externe *sample pump* mit einer Flussrate von 5 mL/min Puffer A (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl; pH 8,0). Zur Abtrennung unspezifisch gebundener Proteine wurde 8 CV mit Puffer A und anschließend 7 CV mit 5 % Puffer B (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 750 mM Imidazol; pH 8,0)

gewaschen. Der Durchlauf und die Waschfraktionen wurden für die SDS-PAGE-Analyse (Kap. 2.2.4.1, S. 39) und Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Kap. 2.2.6.1.1, S. 43) aufgefangen. Anschließend erfolgte die lineare Elution von 5 – 100 % Puffer B über 5 CV, gefolgt von der isokratischen Elution mit 100 % Puffer B für 4 CV. Die eluierenden Proteine wurden fraktioniert (2 mL) aufgefangen und analysiert.

Die Zielprotein-enthaltenen Elutionsfraktionen wurden vereint und zweimal gegen 1 L Puffer A bei 4 °C für 1 h dialysiert. Dazu wurden Dialyseschläuche mit einem MWCO von 3,5 kDa (Spectra/Por® 7 *Dialysis Membrane*) verwendet. Als Maß für die Salzkonzentration wurde die Leitfähigkeit in der Probe vor und nach der Dialyse gemessen (GMH 3430, Greisinger GmbH). Um potenzielle Aggregate von der Lösung zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 50000 x g und 4 °C. Die Proteinkonzentration von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 wurde bestimmt. Im Anschluss wurden 1,5 mL Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

#### 2.2.5.1.1.1 SUMO-Protease Verdau

Für die weitere Proteinpräparation wurde das Fusionsprotein durch Einsatz der hochspezifischen SUMO-Protease gespalten [Malakhov et al., 2004]. Dafür wurde die SUMO-Protease 1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScUlp1) verwendet. Die ScUlp1 wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit aus *E. coli* Zellen nach dem in der Dissertation von Frau Dr. Thümmeler etablierten Protokoll [Thümmeler, 2018] gereinigt. Das Enzym wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1000 eingesetzt. Der Verdau wurde im Wasserbad bei 30 °C für 1 h inkubiert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1, S. 39) ermittelt. Zum Entfernen des His<sub>6</sub>-SUMO-Proteins und der SUMO-Protease, erfolgte ein Zentrifugationsschritt (50000 x g, 30 min, 4 °C). Der Überstand enthielt das SUMO-Protein und SUMO-Protease, Mefp-3 / Mgfp-3 hingegen verblieben im Pellet. Anschließend wurden die Zielprotein-enthaltenen Pellets in 25 % Essigsäure zweimal für 1 h bei 4 °C im Drehteller resolubilisiert. Nach Zentrifugation wurde die Proteinkonzentration der gereinigten Zielproteine Mefp-3 und Mgfp-3 bestimmt. Danach wurden 1,5 mL Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

#### 2.2.5.1.2 Reinigung der mikrobiellen Tyrosinase

Die mikrobielle Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) aus *V. spinosum* wurde rekombinant aus *E. coli* KRX isoliert. Die Reinigung basierte auf Literaturangaben [Axambayeva et al., 2018]. 24 g eingefrorener BFM (Kap. 2.2.3.1.1, S. 36) wurden in 50 mL Resuspensionspuffer (Tabelle 2-14, S. 38) aufgetaut. Die Zellen wurden mittels Homogenisator (Ultra-Turrax®) resuspendiert und anschließend für eine Passage bei ~ 1375 bar im OneShot (OS Model) aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation (100000 x g, 30 min, 4 °C) wurde der RE auf eine Ni(II)-Sepharose-Excel-Säule (XK 26/20, CV = 38 mL) aufgetragen.

Die Beladung erfolgte über einen 150 mL-Superloop mit einer Flussrate von 5 mL/min Puffer A (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol; pH 7,5). Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch einen Waschschrift von 3,5 CV mit 5 % Puffer B (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol; pH 7,5) von der Säule gewaschen. Anschließend wurde His<sub>6</sub>-mTyr mit Puffer B 1,6 CV über einen Gradienten von 5 – 100 % in 2 mL Fraktionen eluiert. Die isokratische Elution erfolgte mit 100 % Puffer B für 2 CV. Der Durchlauf, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1, S. 39) und Protein-konzentrationsbestimmung nach Bradford (Kap. 2.2.6.1.1, S. 43) analysiert.

Die His<sub>6</sub>-mTyr enthaltenen Elutionsfraktionen wurden vereint und gegen 2 L PBS (pH 7,4) bei 4 °C für 1,5 h dialysiert (Dialyseschläuche MWCO von 15 kDa, Spectra/Por® 7 *Dialysis Membrane*). Das Dialysat wurde für 30 min bei 4 °C und 50000 x g zentrifugiert. Das gereinigte Zielprotein His<sub>6</sub>-mTyr wurde anschließend mit Glycerin versetzt, final 50 % (v/v). Aliquots (1 mL) wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei - 80 °C gelagert.

### 2.2.5.1.3 Reinigung von DP1A/B

Als Puffer wurde ein Tris/Natrium-Phosphat-basierter Puffer (pH 8,0) nach Literaturangaben für Mfp verwendet [Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005]. In Vorversuchen zeigte die Zugabe von NaCl zum Puffer einen positiven Effekt auf den Reinigungserfolg von DP1B. Für die chromatografische Reinigung von DP1B im 1 mL Maßstab wurden 1,5 g der eingefrorenen *E. coli* BW3110 BFM in 4 mL Resuspensionspuffer (Tabelle 2-16) aufgetaut und anschließend mittels One Shot (OS Model) für eine Passage bei ~ 1375 bar aufgeschlossen. Die Abtrennung der Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation (100000 x g, 30 min, 4 °C). Der RE wurde auf eine His-Gravity-Column (GE-Healthcare, CV = 1 mL) aufgetragen. Weitere Reinigungsschritte erfolgten nach Herstellerangaben (GE-Healthcare). Die Elution erfolgte in drei Schritten: 500 mM Imidazol (B1), 1 M Imidazol (B2) und 1 M Imidazol + 6 M Harnstoff (B3) (Tabelle 2-16). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1, S. 39) und Western-Blot (Kap. 2.2.4.2, S. 40) analysiert und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay (Kap. 2.2.6.1.2, S. 43) bestimmt.

Die Zielprotein enthaltenen Elutionsfraktionen wurden vereint und zweimal gegen 2 L Puffer A für 1 h bei 4 °C dialysiert (MWCO von 25 kDa, Spectra/Por® 7 *Dialysis Membrane*). Um potenzielle Aggregate von der Lösung zu trennen, erfolgte eine Zentrifugation (50000 x g, 30 min, 4 °C). Das gereinigte Zielprotein DP1B wurde aliquotiert (1 mL), mit flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

**Tabelle 2-16 Zusammensetzung der verwendeten Puffer zur Reinigung von DP1B mittels His-Gravity columns**

Puffer	Zusammensetzung
A	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl (pH 8,0)*
B1	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol (pH 8,0)
B2	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 1 M Imidazol (pH 8,0)
B3	10 mM Tris-HCl, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, 6 M Harnstoff (pH 8,0)

\* Als Resuspensionspuffer Zugabe von 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 10 U/mL Benzonase und 5 mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.2.5.2 Reinigung von DP1A und DP1B mittels *Inverse transition cycling* (ITC)

Als Alternative zu der chromatografischen Reinigung von DP1A wurde das *Inverse transition cycling* (ITC) als Reinigungsstrategie etabliert. DP1A/B enthält als kohäsiven Block ein Elastin-ähnliches Polypeptid (ELP) bestehend aus dem sich wiederholenden Pentapeptid-Motiv (VPGVG)<sub>n</sub> [Desai und Lee, 2015; Desai et al., 2016] (Kap. 1.4.2.1, S. 20). Für die Reinigung von DP1A wurde das Protokoll basierend auf der Arbeit von Meyer und Chilkoti verwendet [Meyer und Chilkoti, 1999; Meyer und Chilkoti, 2002; Meyer und Chilkoti, 2004].

Nach dem enzymatischen Aufschluss von *E. coli* BW3110 pJOE\_DP1A (Kap. 2.2.3.2.2, S. 39) wurde der RE (V<sub>1</sub>) unter Rühren auf 40 °C erhitzt und für 30 min inkubiert. Diese Temperaturerhöhung dient der Ausbildung der intra- und intermolekularen β-Faltblätter von DP1A/B. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 40 min bei 40 °C und 17700 x g, wobei das Zielprotein im Pellet und der Hauptanteil der *E. coli* Proteine in Lösung verbleiben. Das Pellet

wurde dann auf Eis in einem  $\frac{1}{10}V_1$  ( $V_2$ ) Puffer mit geringerer Kaliumchlorid-Konzentration (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl, 250 mM KCl; pH 8,0) aufgenommen und vorsichtig auf Eis resuspendiert. Bei der geringeren Temperatur erfolgt der strukturelle Übergang zu *random-coil* und die DP1A/B-Proteine gehen in Lösung über. Andere *E. coli* Proteine, die bei 40 °C ebenfalls präzipitiert sind, verbleiben hauptsächlich unlöslich. Zur Abtrennung erfolgte eine Zentrifugation (60000 x g, 30 min, 4 °C). Das *cycling* wurde zweimal wiederholt. Im 2. Schritt wurde das Zielprotein enthaltene Pellet nach Inkubation und Zentrifugation bei 40 °C in  $\frac{1}{2} V_2$  ( $V_3$ ) Puffer ohne KCl (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0) aufgenommen. Final wurde das Proteinpellet mit DP1A/B in  $V_3$  des jeweiligen Puffers zur weiteren Verarbeitung aufgenommen (Tabelle 2-17).

**Tabelle 2-17 Finale Resuspensionspuffer zur Lagerung von DP1A/B nach Reinigung mittels ITC**

Nr.	Resuspensionspuffer	Verwendung
1	100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl (pH 8,0)	Untersuchungen am nanoDSF & Messungen an der QCM
2	100 mM $\text{NaCH}_3\text{COO}$ (pH 5,5)	Enzymatische Reaktion mit His <sub>6</sub> -mTyr & Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA
3	50 mM $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (pH 5,0)	Edman-Sequenzierung & Lyophilisation

### 2.2.5.3 Gefriertrocknung (Lyophilisation)

Die in der vorgelegten Arbeit rekombinant hergestellten und aus *E. coli* gereinigten Designer-Proteine wurden in flüssigem  $\text{N}_2$  eingefroren. Anschließend wurden die Proteine bis zur vollständigen Trocknung (Lyovac GT 2-E, Steris, Mentor, USA) lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

## 2.2.6 Analytik

### 2.2.6.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

#### 2.2.6.1.1 Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Test nach Bradford bestimmt [Bradford, 1976]. Das Coomassie-Farbreagens (117 nM Coomassie-Brillantblau G-250, 5 % (v/v) EtOH und 10 % (v/v) 85 %-ige Phosphorsäure) wurde filtriert und mit 10 % (v/v) Glycerin versetzt. Nach 24 h konnte das Reagenz verwendet werden. Für den Test wurden 25  $\mu\text{L}$  Proteinlösung und 975  $\mu\text{L}$  Coomassie-Farbreagens für 2 min inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA (0 – 0,4 mg/mL) in dem jeweiligen Puffer eingesetzt.

#### 2.2.6.1.2 BCA-Assay

Neben der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford wurde der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay [Brown et al., 1989; Smith et al., 1985; Wiechelman et al., 1988] für die Designer-Proteine verwendet. Die erforderlichen Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2-18 aufgelistet. Für den Test wurden 50  $\mu\text{L}$  Proteinlösung und 1 mL Reagenz C für 10 min bei 65 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und für 3 min bei RT gelagert. Anschließend wurde die Extinktion bei 562 nm gegen einen Blindwert ermittelt. Als Kalibrierprotein wurde BSA (0 – 0,5 mg/mL) in dem jeweiligen Puffer eingesetzt.

**Tabelle 2-18 Zusammensetzung der Reagenzien für den BCA-Assay**

Komponente	Zusammensetzung	Zusatzinformation
Reagenz A	1 g/L BCA 20 g/L Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> x H <sub>2</sub> O 1,6 g/L Natriumtartrat – Dihydrat 4 g/L NaOH 9,5 g/L NaHCO <sub>3</sub>	pH 11,25
Reagenz B	40 g/L CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	
Reagenz C	100 % (v/v) Reagenz A 2 % (v/v) Reagenz B	Vor Verwendung frisch herstellen

### 2.2.6.1.3 Absorption bei 280 nm

Basierend auf den Extinktionskoeffizienten der einzelnen Proteine erfolgte die Bestimmung der Konzentration der gereinigten Proteine (außer DP1A/B und DP2) über die Absorption bei 280 nm. Die Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Aminosäuresequenz mit dem *Open Source* Programm von ExPASy „ProtParam“ berechnet (Tabelle 2-19) [Gasteiger et al., 2005]. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach Messung der Absorption bei 280 nm mittels Photometer (NanoDrop).

**Tabelle 2-19: Berechnete Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte für die einzelnen Proteine (ExPASy „ProtParam“)**

Protein	Extinktionskoeffizient (M <sup>-1</sup> · cm <sup>-1</sup> )	Molekulargewicht (kDa)
His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3	32890	19,2
Mefp-3	31400	5,83
His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3	32890	18,99
Mgfp-3	31400	5,59
SUMO-Protease	31525	28,99
His <sub>6</sub> -mTyr	80900	37,5

### 2.2.6.2 Ermittlung des Temperaturübergangs mittels nanoDSF

Die Analyse des reversiblen Temperaturübergangs von DP1A/B und DP2 erfolgte mittels nanoDSF (*differential scanning fluorimetry*). Dabei wird die Verschiebung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz beim Entfalten durch Erfassen der Fluoreszenz bei einer Emissionswellenlänge von 330 und 350 nm gemessen. Die mathematische Grundlage bildet die Freie Enthalpie (früher auch als Gibbs-Energie bezeichnet, engl. *Free Gibbs energy*). Die freie Gibbs-Energie ( $\Delta G$ ) in der Proteinfaltung ist ein thermodynamisches Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass ein Faltungsereignis eintreten kann.  $\Delta G$  setzt die Proteinfaltung auch in Beziehung zu Änderungen der Enthalpie ( $\Delta H$ ) und der Entropie ( $\Delta S$ ) in Abhängigkeit von der Temperatur ( $T$ ). Es gilt bei reversiblen Zustandsänderungen:

$$\Delta G (T_t) = \Delta H (T_t) - T \Delta S (T_t) = 0 \quad (\text{Gl. 2-2})$$

Bei den Berechnungen zur thermodynamischen Stabilität eines Proteins werden immer Gleichgewichtszustände betrachtet. Die thermodynamische Stabilität beschreibt die Energiedifferenz zwischen dem Protein im nativen (gefalteten) und denaturierten (entfalteten) Zustand. Für die Auswertung der Übergänge wird von einem Zweizustandsmodell (engl. *Two state transition model*) ausgegangen [Tanford, 1968]. Die spezifische Übergangstemperatur ( $T_t$ , bei dem die Hälfte des Proteins strukturiert und die andere Hälfte entfaltet vorliegt) kann am Wendepunkt der sigmoidalen Kurve abgelesen werden. Proteine mit einer höheren  $T_t$  sind stabiler, da ein größerer Energieeintrag erforderlich ist, um den Entfaltungsübergang zu erreichen.

Im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit werden keine klassischen Faltungsübergänge betrachtet. Es handelt sich vielmehr um Zustandsänderungen der analysierten Proteine (Kap. 3.3.1, S. 91). Demnach bleibt die zugrundeliegende mathematische Betrachtung die gleiche.  $T_t$  beschreibt hier die Temperatur, bei der die Zielproteine in gleichen Anteilen in den jeweils einen oder anderen Zustand vorliegen. Zur Bestimmung der Übergangstemperaturen mittels nanoDSF kann entweder die Fluoreszenzänderung beider Wellenlängen verwendet werden oder das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten ( $F_{350}/F_{330}$ ) aufgetragen werden. Der Wendepunkt bildet nach 1. Ableitung des Temperaturübergangs das Maximum oder Minimum ( $T_t$ ) ab. Die Messung ist unabhängig von der Pufferzusammensetzung und  $T_t$  kann über einen Konzentrationsbereich von 250 mg/mL bis zu 5 µg/mL analysiert werden.

Die Experimente wurden am nanoDSF-Gerät der Firma NanoTemper Technologies GmbH (Prometheus NT.48) durchgeführt. Untersucht wurde sowohl die Heiz- als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min. Für die Messungen wurde je nach Probenbeschaffenheit eine Anregungsintensität des Lasers von 45 – 100 % gewählt. 10 µL der Probe wurden in einer Kapillare (Prometheus NT.48 Series nanoDSF *Grade Standard Capillaries*) aufgenommen, in den vortemperierten Probenhalter eingesetzt und als technisches Triplikat ( $n = 3$ ) parallel gemessen. Für die Analyse wurden je nach DP verschiedene Puffer verwendet (Tabelle 2-20). Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).

**Tabelle 2-20 Pufferzusammensetzung der mittels nanoDSF untersuchten Proteine**

Protein	Puffer / Lösung
Mfp-3	5 % Essigsäure
DP1A/B	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0
DP2	10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 200 mM NaCl; pH 8,0

### 2.2.6.3 Messung der dynamischen Lichtstreuung

Die Untersuchungen zur dynamischen Lichtstreuung (DLS) zur Bestimmung der Partikelgröße und des Zetapotenzials der DP1A-Variante erfolgten am Malvern Instruments Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical GmbH, Deutschland). Die Messungen wurden in der Abteilung Pharmazeutische Technologie (Prof. Mäder, MLU Halle) in Zusammenarbeit mit Eike Busmann durchgeführt. Für die Analyse wurde das Protein in verschiedenen Konzentrationen untersucht: 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL; 0,4 mg/mL. Die Proteine lagen in 10-fach verdünnten Basispuffer (1 mM Tris-HCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaCl; pH 8.0) vor, um die Ausbildung der Agglomerate besser verfolgen zu können. Die Pufferlösungen wurden vor der Analyse filtriert (0,2 µm Sterilfilter). Die Messungen erfolgten jeweils in Dreifachbestimmung bei einem Messwinkel von 173 ° (*Backscatter*) mit 15 Durchläufen (*runs*) pro Messung bei 25 °C.

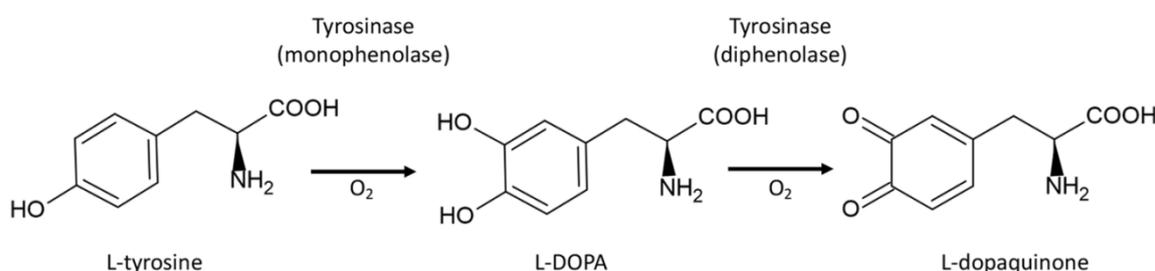
### 2.2.6.4 Analyse der His<sub>6</sub>-mTyr Aktivität

#### 2.2.6.4.1 Kontinuierlicher photometrischer Aktivitätstest

Basierend auf der Publikation von [Duckworth und Coleman, 1970] zur Bestimmung der spezifischen Tyrosinaseaktivität, wurde die Methode für die kommerzielle Pilz-Tyrosinase von Sigma modifiziert. Dieser Assay wurde zur Bestimmung der Aktivität durch Messung der Absorptionsänderung bei 280 nm verwendet. Als Substrat wurde Tyr eingesetzt, welches durch His<sub>6</sub>-mTyr zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) umgewandelt wird. Durch die Hydroxylierung nimmt die Absorption bei 280 nm zu. Üblicherweise wird die kommerziell erhältliche Pilz-Tyrosinase aus *Agaricus bisporus* von Sigma verwendet (Kap. 1.4.1.1.3, S. 17) und wurde

daher zum Vergleich analysiert. Entgegen der allgemeinen Definition einer *Unit* für Enzymaktivität, wurde in diesem Assay von Sigma eine andere Definition festgelegt. Dabei führt eine *Unit* zu einem Anstieg bei  $A_{280}$  von 0,001 pro Minute bei pH 6,5 und 25 °C in einem 3 mL-Reaktionsgemisch mit L-Tyr.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bedingungen wie folgt angepasst:  $T = 37\text{ °C}$ ,  $V_{\text{Reaktion}} = 2,44\text{ mL}$ . Vor der Reaktion wurden die Komponenten für 5 min bei 37 °C inkubiert. In einer Quarzküvette ( $d = 10\text{ mm}$ ) wurden temperiertes Tyr, Puffer,  $dH_2O$  und  $CuSO_4$  gemäß Tabelle 2-21 vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Tyrosinase gestartet und die Absorption bei 280 nm kontinuierlich am NanoDrop unter Rühren bei 37 °C für 4 min verfolgt. Als Referenz diente ein Reaktionsansatz ohne Enzym.



**Abb. 2-1 Umwandlung von L-Tyrosin in L-DOPA und L-Dopachinon, katalysiert durch Tyrosinase [Agunbiade und Roes-Hill, 2022].**

**Tabelle 2-21 Pipettierschema für die enzymatische Reaktion**

Komponente	Stammlösung	Volumen	finale Konzentration
Puffer ( $KH_2PO_4$ ; pH 6,5)	50 mM	852 $\mu$ L	17,5 mM
Enzym	Variabel		
His <sub>6</sub> -mTyr		4,48 $\mu$ L	0,61 $\mu$ g/mL
Pilz-Tyrosinase (Sigma)		21,8 $\mu$ L	6,82 $\mu$ g/mL
$CuSO_4$	1,63 mM	3 $\mu$ L	2 $\mu$ M
Tyrosin	1 mM	834 $\mu$ L	0,34 mM
$dH_2O$	-	Variabel	-
Total		2440 $\mu$ L	

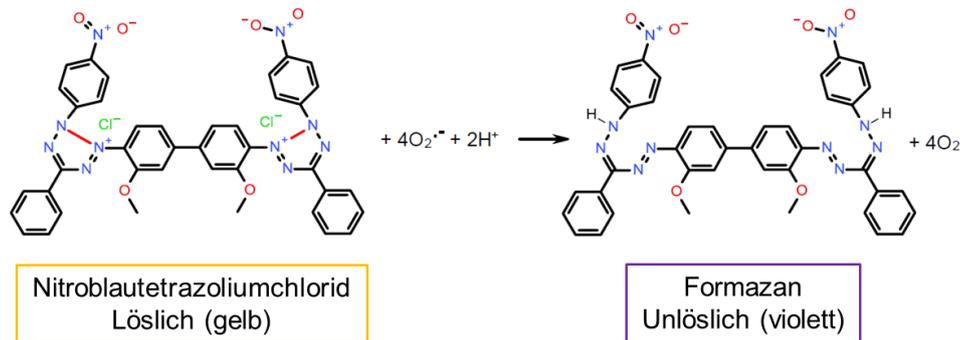
#### 2.2.6.4.2 *In vitro* Modifikation der Designer-Proteine

Die Modifikationsreaktion der Proteine erfolgte in Reaktionspuffer (100 mM Na-acetat, 25 mM Ascorbinsäure, 20 mM Na-Borat, 2  $\mu$ M  $CuSO_4$ ; pH 5,5) für 5 h bei 25 °C im Wasserbad. Im Ansatz wurden folgende Konzentrationen an Zielprotein eingesetzt: 0,3 mg/mL (Mfp-3) und 0,9 mg/mL (DP1A/B, DP2). In einer Studie zur Adhäsion von Mefp-5 an Mica wurde für modifiziertes Mefp-5 gezeigt, dass bei pH 7 – 8 die Komplexierung mit Borat Peptid-gebundenes DOPA vor weiterer Oxidation schützt. Die Adhäsion von boratgeschütztem Mefp-5 war für pH 3 als auch für pH 8 vergleichbar [Kan et al., 2014]. Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit für alle *in vitro* Modifikationen der DP die Zugabe von final 20 mM Na-Borat im Reaktionsansatz. Die enzymatische Reaktion wurde mit 50  $\mu$ g/mL His<sub>6</sub>-mTyr gestartet und nach 5 h beendet. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung wurden die Reaktionsgefäße nicht verschlossen und der Reaktionsansatz jede Stunde durch Pipettieren gemischt. Für die SDS-PAGE-Analyse und den Nachweis von DOPA durch NBT-Färbung

(Nitroblautetrazoliumchlorid) (Kap. 2.2.6.4.2, S. 46) erfolgte die Probenentnahme jeweils vor und nach der Reaktion.

#### 2.2.6.4.3 Qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung

Die NBT-Färbung (Nitroblautetrazoliumchlorid) ist eine qualitative Analysemethode zum spezifischen Nachweis von Chinen. Chinone katalysieren bei basischem pH-Wert einen Redox-Zyklus mit Gly als Reduktionsmittel [Paz et al., 1991]. Dabei wird ein Superoxid gebildet, welches in Gegenwart von NBT und molekularem Sauerstoff Tetrazolium zu Formazan reduziert (Abb. 2-2). Die Reaktion kann optisch durch einen Farbumschlag von gelb zu violett verfolgt werden. Diese Eigenschaft der Chinonoidverbindungen wird für die gezielte Färbung von Chinon-haltigen Proteinen (z.B. DOPA-enhaltende Proteine) genutzt.



**Abb. 2-2: Reaktionsmechanismus von NBT mit Superoxid zur Bildung von NBT-Formazan und zweiatomigem Sauerstoff modifiziert nach [Bakr und Rahaman, 2016]**

Für die NBT-Färbung wurden 2 – 5  $\mu\text{L}$  Probe auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert oder die zu analysierenden Proteine wurden nach SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1, S. 39) auf die Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot (Kap. 2.2.4.2, S. 40) transferiert. Die Membran wurde anschließend für 45 min in einer NBT/Glycinat-Lösung (0,6 mg/mL NBT in 2 M Kaliumglycinat-Puffer; pH 10) unter Lichtausschluss inkubiert. Die gefärbte Nitrozellulosemembran wurde nacheinander zweimal mit Natriumborat-Lösung (0,16 M Natriumtetraborat Decahydrat) gewaschen und für ~ 16 h in der Natriumborat-Lösung inkubiert. Final wurde die Membran mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen, getrocknet und zum Digitalisieren des Ergebnisses eingescannt.

#### 2.2.6.4.4 Bestimmung der Hydroxylierungen mittels Massenspektrometrischer Analyse

Die Massenspektrometrischen Analysen wurden hauptsächlich am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI) mit Dr. Marcel Naumann durchgeführt und analysiert. Zu Beginn wurden die Proteinproben vor der MALDI-TOF/TOF Analyse durch Flüssigchromatografie gereinigt (Kap. 8.1.2.1.1.1, S. 168). Proteinhaltige Fraktionen wurden auf einem MALDI-Proben-träger mit den MALDI-Matrices S-DHB (Mischung aus 2,5-Dihydroxy-benzoessäure und 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoessäure) und DHAP (2,5-Dihydroxyaceto-phenon) kokristallisiert (Tabelle 8-3, S. 169). Die Massenspektren wurden an einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Autoflex Speed, Bruker Daltonics) mit positiver Polarität sowohl im linearen Modus (Molmassenbestimmung) als auch im Reflektormodus (ISD- und T3-Analyse) aufgenommen (Kap. 8.1.2.1.1.2, S. 169). Die Bestimmung der Molekülmassen basierte auf den Masse-Ladungs-Verhältnissen ( $m/z$ ) von einfach und mehrfach geladenen Molekülonen, die in den erfassten Massenspektren beobachtet wurden. Der jeweilige Mittelwert wurde zum Vergleich mit den theoretischen Molekülmassen der Designer-Proteine verwendet, die anhand der Aminosäuresequenzen im Open Source Tool „PeptideMass“

([https://web.expasy.org/peptide\\_mass/](https://web.expasy.org/peptide_mass/)) berechnet wurden. (Kap. 8.1.2.1.1.2.2, S. 170). Die Sequenzverifikation der Proteintermini erforderte den Einsatz einer speziellen Technik der Massenspektrometrie, die als In-Source-Decay (ISD) bezeichnet wird (Kap. 8.1.2.1.1.2.4, S. 170). Die detaillierte Beschreibung der Messmethodik ist dem Anhang (Kap. 8.1.2.1, S. 168) zu entnehmen.

### 2.2.6.5 Edman-Sequenzierung

Zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz der DP1A-Variante wurde durch einen externen Dienstleister (Proteome Factory AG, Berlin) eine N-terminale Proteinsequenzierung der ersten fünf Aminosäuren nach Edman durchgeführt ( $n = 4$ ). Die Messung erfolgte an einem Applied Biosystems Model 494 Procise Edman Sequencer mit online ABI Model 140C PTH Amino Acid Analyser.

## 2.2.7 Materialwissenschaftliche Untersuchungen

### 2.2.7.1 Untersuchungen zur Proteinadsorption (QCM-D Messungen)

Die Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (QCM-D, englisch *Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring*) ist ein Messverfahren, mit der kleinste Massenänderungen in Echtzeit bis in den Nanogramm-Bereich ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) detektiert werden können [Rodahl et al., 1997]. Die Technik basiert auf der präzisen Oszillation der Quarzsensoren (piezoelektrischer Effekt) bei ihrer Resonanzfrequenz ( $f_0$ ), wenn eine externe Wechselspannung (Sinuswelle) angelegt wird. Dieses stabile Schwingungsverhalten des Quarzes kann zur Detektion von Adsorptions- und Desorptionsprozessen an Sensoroberflächen z.B. von Proteinen (elektrostatische Anziehungskräfte zwischen entgegengesetzten Ladungen, Van-der-Waals-Kräfte, H-Brückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen) genutzt werden [Höök et al., 2001]. Die Massenänderung ( $\Delta m$ ) an der Sensoroberfläche oder die Benetzung wird als Änderung der Frequenz erfasst ( $\Delta f$ ). Darüber hinaus liefert die Änderung der Energiedissipation aus dem System ( $\Delta D$ ) beim Abschalten der Stromversorgung Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften der Probe [Edvardsson et al., 2005]. Dabei sind weiche, hoch viskoelastische Moleküle in der Lage, das Ausschwingverhalten des Quarzes stärker zu beeinflussen als starre kleine Moleküle, welche durch die Interaktion mit der Umgebung z. B. durch Reibung nur eine geringe Energiedämpfung verursachen.

Der Zusammenhang zwischen der messbaren Frequenzänderung und der Massenänderung an der Sensoroberfläche wurde erstmals 1959 von Günther Sauerbrey beschrieben [Sauerbrey, 1959]. Die aus dieser Arbeit entwickelte Gleichung, die sogenannte Sauerbrey-Gleichung (Gl. 2) beschreibt die proportionale Massebeladung des Quarzes zur Frequenzänderung in Abhängigkeit der Sauerbrey-Konstante.

$$\Delta m = -C_{QCM} \times \frac{\Delta f_n}{n} \quad (\text{Gl. 2-3})$$

$\Delta m$  = Massenänderung, Faktor  $C_{QCM}$  = Sauerbrey-Konstante ( $17,7 \text{ ng}/\text{cm}^2 \cdot \text{Hz}^1$  bei einer Grundfrequenz von  $f_0 = 5 \text{ MHz}$ ),  $\Delta f_n$  = Änderung der Resonanzfrequenz

Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens von Muschelfußproteinen wurde die QCM bereits häufig eingesetzt [Höök et al., 2001; Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2007; Hwang et al., 2004; Kim et al., 2018]. Für das Muschelfußprotein 5 aus *Mytilus galloprovincialis* wurden beispielsweise Frequenzänderung von ca. 20 Hz (unmodifiziert, Mgf-p-5) bis ca. 40 Hz

(modifiziert, Mgf-5<sub>DOPA</sub>) mit Gold-beschichteten Quarzsensoren bestimmt. Ein Vorteil dieser Methode ist die geringe Probenmenge, die für die Messung benötigt wird [Marx, 2003].

Die Untersuchungen zur Adsorption wurden mit dem qCell T System (3T Analytik GmbH, Tuttlingen, Deutschland) durchgeführt. Bei allen Messungen wurden piezoelektrische AT-geschnittene Quarzkristallsensoren verwendet, welche mit einer 100 nm Schicht aus Ti-Au-Ti-SiO<sub>2</sub> (Siliziumdioxid-Sensoren, SiO<sub>2</sub>) beschichtet waren. Die Rauigkeit der Sensoroberflächen betrug  $0,9 \pm 0,2$  nm. Die Anregung des Schwingquarzes erfolgte mittels der goldbeschichteten Kontaktfläche auf der Kristallunterseite, die für die Datenübermittlung der Frequenz- und Dissipationswerte verantwortlich ist. Die Grundfrequenz (Resonanzfrequenz) des QCM-D Systems betrug durchschnittlich 10 MHz. Die Datenaufnahme erfolgte mittels der Software qCell T 1.9 (3T Analytik GmbH, Tuttlingen, Deutschland) und die Auswertung der Messdaten mittels der gerätespezifischen Software qGraph Viewer 1.9.

**Tabelle 2-22 Aufbau der QCM-D Messmethodik zur Proteinadsorption an einer SiO<sub>2</sub>-Oberfläche. Auswahl der Messparameter erfolgte nach [Petroni et al., 2015] und wurden für das qCell T 1.9 System angepasst.**

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Schritte mit einer Flussrate von 60 µL/min bei 25 °C durchgeführt. Die Zeitangaben in Klammern repräsentieren die Haltephasen nach jedem Schritt ohne Fluss.

Probe	Stammlösung	Äquilibrium mit PBS	Vorkonditionierung mit 5 % HAc	Protein-Applikation	Waschschritt mit PBS
Mefp-3	0,1 mg/mL in 5 % HAc	3 min	8,5 min	10 min	10 min
Mod. Mefp-3		(2 min)	(2 min)	(3 min)	(3 min)
Mgf-3	0,1 mg/mL in 25 % HAc	3 min	8,5 min	10 min	10 min
Mod. Mgf-3		(2 min)	(2 min)	(3 min)	(3 min)
DP1A-Variante	0,1 mg/mL in Basispuffer	3 min	-	10 min	10 min
Mod. DP1A-Variante		(2 min)		(3 min)	(3 min)
DP2	0,1 mg/mL 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 200 mM NaCl (pH 8,0)	3 min	-	10 min	10 min
Mod. DP2		(2 min)		(3 min)	(3 min)
BSA (neg. Kontrolle)	1 mg/mL in PBS	3 min (2 min)	-	10 min (3 min)	10 min (3 min)
MAPTrix™ ECM (pos. Kontrolle)	0,1 mg/mL in 5 % HAc	3 min (2 min)	-	10 min (3 min)	10 min (3 min)

HAc – Essigsäure, Basispuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0)

Zunächst wurden die Quarzsensoren mit 70 % EtOH und ddH<sub>2</sub>O gespült, und vor Einsetzen in die Messkammer mit Stickstoff getrocknet. Die Proteinproben wurden vor Beginn der Messung auf Eis aufgetaut, 10 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert und vom Überstand die Proteinkonzentration (Kapitel 2.2.6.1.2 und 2.2.6.1.3) bestimmt. Für die Versuche wurde eine Stammlösung von 0,1 mg/mL (wenn nicht anders angegeben) hergestellt. Nach dem Einspannen der Sensoren in die Durchflusszelle erfolgte die Äquilibriumierung mit PBS bei 25 °C für ca. 10 min und einer Flussrate von 120 µL/min bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie der Frequenzänderung. Die Messmethode für die Proteinadsorption der verschiedenen Proteine ist in Tabelle 2-22 zusammengefasst. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt ( $n \geq 3$ ).

Die Reinigung der SiO<sub>2</sub>-Sensoren erfolgte nach Literaturangaben [Penfold et al., 2002; Vig, 1985]. Anstelle von UV/Ozon wurden die Quarzsensoren mittels Sauerstoffplasma zweimal 30 s bei 1 Pa O<sub>2</sub> und 150 W (Fraunhofer IMWS) behandelt. Die Sensoren wurden anschließend für 30 min in einer 2-%igen (w/v) SDS-Lösung bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert

und anschließend intensiv mit ddH<sub>2</sub>O gespült. Final wurden die Quarzsensoren mit Stickstoff getrocknet.

### 2.2.7.2 Zug-Scher-Versuche

Die Bestimmung der Zug-Scher-Eigenschaften der Designer-Proteine (DP) erfolgte an einer Zwick Universalprüfmaschine (Klasse 1) des Typs ProLine Z020 (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm) mit einer Maximalkraft von 10 kN. Die Prüfung wurde angelehnt an die Norm DIN EN 1465 [DIN, 2009] sowie die EN ISO 291 [CEN, 2008]. Dafür wurden Micaplatten (25 x 75 mm, Science Services GmbH, München) mit einer Überlappungsfläche (Klebefläche) von 12,5 mm x 25 mm verwendet. Im Zuge der Probenvorbereitung wurden die Micaplatten mit 70 % EtOH bei RT gesäubert. Zur Proteinapplikation wurden 20 ± 0,5 mg pro Protein (DP, BSA) mit 40 µL 50 mM NaAc (pH 5.0) auf dem Fügeteil homogenisiert. Anschließend wurde das zweite Fügeteil aufgebracht und leicht angepresst (Tabelle 2-23). Als Positivkontrolle wurde ein synthetischer PVA – basierter Mehrzweckkleber „Elmers Glue“ (Elmer's Products, Westerville, USA) [Down, 2015] verwendet, der in der Literatur standardmäßig verwendet wird [Cha et al., 2009; Jenkins et al., 2017]. Jeweils 50 µL (Ø 19 mg) mit einer durchschnittlichen Trockenmasse von ca. 38 % (Kap. 8.2, Tabelle 8-10, S. 192) wurden mit einer Verdrängungspipette auf eines der Fügeteile aufgetragen, homogen verteilt und mit dem zweiten Fügeteil verklebt. Die Konditionierung der Probenstreifen erfolgte nach dem in Tabelle 2-23 aufgeführten Schema und orientierte sich an der in EN ISO 291 festgelegten Labor-Normalklimate [Standardization, 1998].

**Tabelle 2-23 Konditionierungsbedingungen der Prüfkörper zur Testung der Zug-Scher-Eigenschaften**

Schritt	Bedingung (°C / %)	Dauer (h)	Details
I	23 ± 2 / 50 ± 5	1 ± 0,25	Zuvor 30 s Handpressen bei RT
II	50 / 25	88	Inkubation in Klimaschrank (ICH110, Memmert) unter konstantem Druck von 20 kPa durch genormte Gewichte (m = 636,46 g) auf Überlappungsfläche
III	23 ± 2 / 50 ± 5	1	Ohne Gewichte

Die verklebten Micaplatten wurden symmetrisch in den Einspannklemmen fixiert und die Einspannlänge wurde so eingestellt, dass sich jede Einspannklemme in einem Abstand von 40 ± 1 mm von der nächstgelegenen Kante der Überlappung befand. Der Zugversuch wurde bei RT durchgeführt und die Prüfgeschwindigkeit betrug 2 mm/min. Die Aufzeichnung der charakteristischen Spannungs-Dehnungs-Kurven erfolgte bis zum Bruch der Probe und die Prüfung wurde beendet. Jede Probenart wurde je nach Versuch drei- bis fünfmal durchgeführt (n ≥ 3). Zur Steuerung, Datenerfassung und Auswertung der Messdaten wurde die gerätespezifische Software „TestXpert II“ verwendet. Die Zug-Scher-Festigkeit oder Bruchspannung wird dabei durch Division der Bruchkraft (in N) durch die Klebefläche (in mm<sup>2</sup>) berechnet (s. Gl. 3). Die Zug-Scher-Festigkeit wird in MPa (MPa = 1 N/mm<sup>2</sup>) bzw. in kPa (bei feuchten Proben) angegeben.

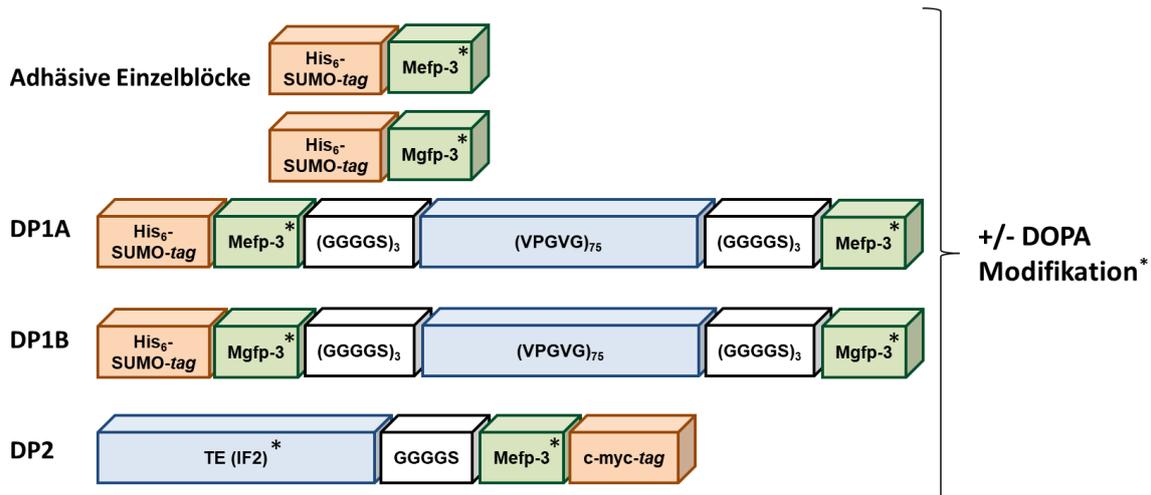
$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (\text{Gl. 2-4})$$

σ – Zug-Scher-Festigkeit, F – Bruchkraft, A – Querschnittsfläche der Probe

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Muschelfußprotein-3-basierte Fusions-Bibliothek

In der vorliegenden Arbeit wurde das Muschelfußprotein-3 (Mfp-3) als adhäsiver Protein-Block für das Design der neuartigen Bindeproteine untersucht (Kap. 1.4.1, S. 11). Aus diesem Grund lag das Design der Proteine in einer Mfp-3-basierten Fusions-Bibliothek im Fokus. Das Design der untersuchten Proteine ist in Abb. 3-1 schematisch dargestellt. Eine detaillierte Übersicht zum modularen Aufbau der Designer-Proteine der Mfp-3-basierten Fusions-Bibliothek ist in Tabelle 3-1 gezeigt.



**Abb. 3-1 Modularer Aufbau der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Designer-Proteine (DP)**

Die Designer-Proteine (DP) der Muschelfußprotein-3-basierten Fusions-Bibliothek bestehen aus vier Protein-Blöcken des in Kap. 1.3 (S. 9) vorgestellten Baukastensystems: *tag*-Sequenzen (orange), Linker-Sequenzen (weiß), adhäsive Blöcke (grün) und kohäsive Blöcke (blau). Neben den DP, die eine Kombination aus kohäsiven und adhäsiven Protein-Blöcken enthalten, wurden ebenfalls Mfp-3 Einzelblöcke in einer His<sub>6</sub>-SUMO-Fusion designiert. Die DP1-Proteine enthalten ELP-Sequenzen und das DP2-Protein TE als kohäsive Einheit. SUMO – engl. *Small Ubiquitin-related MOdifier*, Mefp-3 – Muschelfußprotein-3 aus *M. edulis*, Mgfp-3 – Muschelfußprotein-3 aus *M. galloprovincialis*, (VPGVG)<sub>75</sub> – ELP-Sequenz, ELP – Elastin-ähnliche Polypeptide, TE (IF2) – Tropoelastin, Isoform 2. Alle Proteine wurden nach Produktion und Reinigung in der vorliegenden Arbeit mittels mikrobieller Tyrosinase modifiziert. Dabei werden Peptid-gebundene Tyrosine zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydroxyliert (mit \* markiert).

**Tabelle 3-1 Übersicht des modularen Aufbaus der Designer-Proteine in der Mfp-3-basierten Fusionsbibliothek.**

SUMO – engl. *Small Ubiquitin-related MOdifier*, Mefp-3 – Muschelfußprotein-3 aus *M. edulis*, Mgfp-3 – Muschelfußprotein-3 aus *M. galloprovincialis*, (VPGVG)<sub>75</sub> = ELP – Elastin-ähnliches Polypeptid, TE (IF2) – Tropoelastin, Isoform 2, MW – Molekulargewicht.

Protein	Protein-Blöcke (N → C-terminal)						MW (kDa)
	1	2	3	4	5	6	
Mefp-3	His <sub>6</sub> -SUMO	Mefp-3	-	-	-	-	19,2
Mgfp-3	His <sub>6</sub> -SUMO	Mgfp-3	-	-	-	-	19,0
<b>DP1-Proteine</b>							
DP1A	His <sub>6</sub> -SUMO	Mefp-3	(GGGGS) <sub>3</sub>	VPGVG 75	(GGGGS) <sub>3</sub>	Mefp-3	57,9

DP1B	His <sub>6</sub> -SUMO	Mgfp-3	(GGGGS) <sub>3</sub>	VPGVG <sub>75</sub>	(GGGGS) <sub>3</sub>	Mgfp-3	57,4
<b>DP2-Protein</b>							
DP2	TE (IF2)	GGGGS	Mefp-3	c-myc	-	-	67,3

### 3.1.1.1 Adhäsive Einzelblöcke

Für die materialwissenschaftlichen Analysen sollten vergleichend zu den Designer-Proteinen (DP), die eine Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken enthalten, die adhäsiven Einzelblöcke untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die Muschelfußproteine-3 aus *Mytilus edulis* (Mefp-3) und *Mytilus galloprovincialis* (Mgfp-3) als Einzeldomänen ausgewählt. Die Mfp-3 wurden als His<sub>6</sub>-SUMO-Fusionsproteine designt (Abb. 3-1, S. 51). Die Kombination mit dem N-terminalen Hexahistidin-*tag* ermöglicht eine klassische Reinigung der Fusionskonstrukte über Affinitätschromatografie. Die Ergebnisse sind in Kap. 3.3.2 (S. 96) gezeigt.

### 3.1.1.2 DP1-Proteine

Die Proteine mit der Bezeichnung DP1 enthalten die Blöcke Mfp-3 (adhäsiv) und ELP (kohäsiv). Dabei wurde in DP1A die Sequenz für Mefp-3 und in DP1B für Mgfp-3 eingebaut (Abb. 3-1; Tabelle 3-1, S. 51). Als zentraler Protein-Block in DP1A/B wurde ein ELP basierend auf der Arbeit von [Desai et al., 2016] gewählt. Das 75-fache Pentapeptid-*Repeat* besteht aus VPGVG. Desai und Kollegen konnten für dieses Polypeptid eine spezifische Übergangstemperatur ( $T_t$ ) bei 32 °C zeigen. Diese Eigenschaft soll in den DP1-Proteinen genutzt werden, um die kohäsiven Kräfte zu gewährleisten.

Die ELP-Sequenz wird von den Mfp-3-Blöcken flankiert, um diese im Klebeprozess zu exponieren und so eine größere Klebefläche abzudecken. In der Primärstruktur werden die Mfp-3-Blöcke durch einen flexiblen Linker GGGGS<sub>n</sub> vom ELP-Block getrennt (Kap. 1.4.2.1, S. 20). Zur Gewährleistung der temperaturinduzierten strukturellen Veränderungen im ELP-Teil wurde hier ein 3-fach Linker ( $n = 3$ ) verwendet. Die DP1-Proteine wurden als His<sub>6</sub>-SUMO-Fusionsproteine designt, um die Proteine sowohl in der Produktion als auch in der Aufarbeitung mit den adhäsiven Einzeldomänen vergleichen zu können. Die Ergebnisse sind Kap. 3.2.3 (S. 67) zu entnehmen.

### 3.1.1.3 DP2-Proteine

Das DP2-Protein enthält Tropoelastin (TE, Isoform-2) als kohäsiven Block (Abb. 3-1; Tabelle 3-1, S. 51). TE zeigt ähnliche Eigenschaften wie ELP. Durch die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Polypeptidketten entsteht eine hohe Stabilität und Zugfestigkeit und eignet sich somit als kohäsive Einheit (Kap. 1.4.2.1; S. 20). DP2 enthält N-terminal die TE-Sequenz (kohäsiv), gefolgt von einem flexiblen Linker (GGGGS)<sub>1</sub> und einem Mefp-3-Block (adhäsiv). Aufgrund der Informationen zum Koazervationsverhalten von TE durch Temperaturerhöhung [Vrhovski und Weiss, 1998] und der bekannten unstrukturierten Bereiche in der Polypeptidkette [Taranova et al., 2018; Taranova et al., 2019], war ein kurzer GGGGS<sub>n</sub>-Linker ( $n = 1$ ) ausreichend. C-terminal ist ein c-myc-tag zur Detektion während der Produktion und Reinigung mittels Western-Blot eingebaut. Die Ergebnisse zur Proteinexpression in *E. coli* sind in Kap. 3.2.4.1.1 (S. 84) gezeigt.

## 3.2 Heterologe Proteinproduktion inklusive Aufarbeitung

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zur heterologen Produktion der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Designer-Proteine (DP) in *E. coli* vorgestellt. Zu jedem Protein werden nachfolgend die rekombinante Produktion im Schüttelkolbenmaßstab (SK) und/oder Bioreaktormaßstab, die Reinigung der Biomasse, sowie die Funktionalisierung mit der in Kap. 3.2.1 (S. 53) hergestellten mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) gezeigt. Im Anschluss an die *in vitro* Modifikation mit His<sub>6</sub>-mTyr wurde der Erfolg der Reaktion mit zwei unterschiedlichen Methoden überprüft: dem qualitativen Nachweis mittels NBT-Färbung (Kap. 2.2.6.4.2, S. 46) und der quantitativen Bestimmung der Hydroxylierungen innerhalb der Proteine mittels MALDI-TOF/TOF-MS (Kap. 2.2.6.4.4, S. 47).

### 3.2.1 Mikrobielle Tyrosinase als Werkzeug-Enzym zur Modifikation der Designer-Proteine

Zur Funktionalisierung der DP für die spezifische Anwendung auf SiO<sub>2</sub> – Oberflächen ist eine *in vitro* Modifikation zum Einbau von DOPA notwendig. Wie in Kapitel 1.4.1.1.3 (S. 17) erläutert, ist mTyr eine vielversprechende Alternative zur Pilz-Tyrosinase aus *A. bisporus*, die überwiegend in der Literatur zur Hydroxylierung von Tyr zu DOPA in Muschelfuß-basierten Peptiden oder Proteinen verwendet wird. Die Tyrosinase, die für die Hydroxylierung von Tyrosinresten in den Proteinen verwendet wurde, stammte aus *V. spinosum* (Kap. 2.1.5, S. 28).

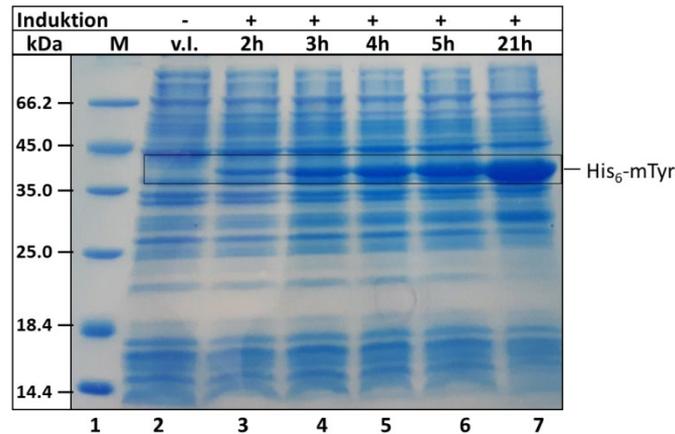
#### 3.2.1.1 Heterologe Produktion in *E. coli*

Das Gendesign erfolgte basierend auf Literaturangaben [Axambayeva et al., 2018]. Die Gensequenz wurde dem GenBank-Eintrag WP\_081452337.1 entnommen. Diese kodiert nur für die katalytische Domäne der mTyr, jedoch nicht für die inaktivierende C-terminale Domäne (Kap. 1.4.1.1.3, S. 17). Zusätzlich wurde eine Sequenz kodierend für einen N-terminalen His<sub>6</sub>-tag eingebaut. Die finale Gensequenz wurde für die Produktion in *E. coli* Codon-usage optimiert. In der Literatur wurde *E. coli* BL21 (DE3) als Produktionsstamm verwendet. Um die Syntheseleistung von His<sub>6</sub>-mTyr zu verbessern, erfolgte in der vorliegenden Arbeit ein Stammwechsel zu *E. coli* KRX (Kap. 2.1.7.2, S. 29).

Zunächst erfolgte die Transformation von *E. coli* KRX mit dem Zielvektor pET28\_mTyr (Kap. 2.2.2.3.1, S. 35). Die Kultivierung und Expression (Kap. 2.2.3.1.1, S. 36) wurde in TB Komplexmedium untersucht. Im 100 mL Schüttelkolbenmaßstab (SK) wurden die Induktionsdauer (2 – 22 h) und die Induktor-Konzentration (Rhamnose: 5 mM und 10 mM) bei 30 °C untersucht und verglichen. Es zeigte sich, dass bereits nach 4 h Induktion eine starke Überexpression erfolgte. Jedoch befand sich der Großteil von His<sub>6</sub>-mTyr nach 4 h in der unlöslichen Fraktion. Im Gegensatz dazu konnte nach 22 h Induktion ~ 50 % an synthetisierten His<sub>6</sub>-mTyr in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Abundanz des Zielproteins im Rohextrakt wurde keine weitere Optimierung der Kultivierungsbedingungen durchgeführt.

Die Produktion erfolgte anschließend in 6 x 500 mL SK, um ausreichende Mengen für die *in vitro* Modifikation der Designer-Proteine bereitzustellen. Die finalen Kultivierungsparameter sind Tabelle 2-12 (Kap. 2.2.3.1.1, S. 37) zu entnehmen. In Abb. 3-2 ist das SDS-PA-Gel der rekombinanten Produktion von His<sub>6</sub>-mTyr dargestellt. In der Probe vor Induktion (Spur 2) ist keine Bande auf der zu erwartenden Höhe der His<sub>6</sub>-mTyr zu sehen. Über die Induktionszeit von 2 – 21 h (Spur 3 – 7) ist eine deutliche Zunahme der Expressionsbande bei ca. 37,5 kDa erkennbar. Zusammenfassend war die heterologe Produktion von His<sub>6</sub>-mTyr in *E. coli* KRX in

TB-Medium erfolgreich. Etwa die Hälfte des Zielproteins reichte sich in der löslichen Zellfraktion an (Abb. 3-3, S. 54). Aus der 3 L Kultur wurden 36 g Biofeuchtmasse (BFM) gewonnen und bei - 80 °C gelagert.

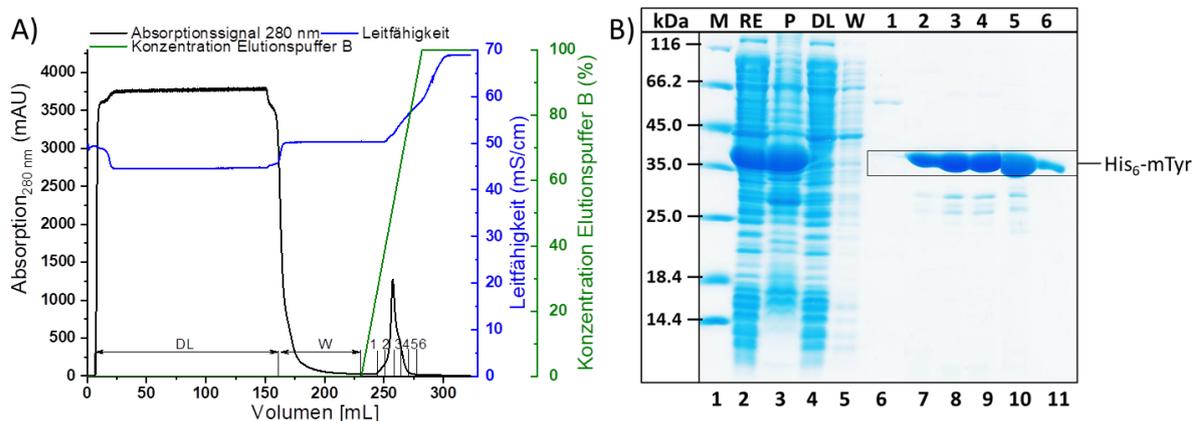


**Abb. 3-2 SDS-PA-Gel der Produktion von His<sub>6</sub>-mTyr in *E. coli* KRX in TB-Medium bei 30 °C**

12,5 %iges SDS-PA-Gel der 1/OD<sub>600</sub>-Proben vor (-) und nach (+) den verschiedenen Induktionszeiten (2 h – 21 h). Die Kultivierung von *E. coli* KRX pET28(a)\_mTyr erfolgte in TB Medium bei 30 °C unter Schütteln. Aufgetragen wurden 10 µL Probe und 5 µL Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). M – Marker, v.l. – 1/OD<sub>600</sub> Probe vor Induktion. Das Zielprotein His<sub>6</sub>-mTyr ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 37,5 kDa).

### 3.2.1.2 Chromatografische Reinigung der mikrobiellen Tyrosinase

Die Aufarbeitung von His<sub>6</sub>-mTyr erfolgte mittels Affinitätschromatografie über den N-terminalen His<sub>6</sub>-tag aus der in Kap. 3.2.1.1 produzierten Biomasse. Die Reinigung basierte auf Literaturangaben [Axambayeva et al., 2018] und die experimentellen Bedingungen sind in Kap. 2.2.5.1.2 (S. 41) beschrieben. Das Chromatogramm (A) und das dazugehörige Gel (B) der SDS-PAGE-Analyse sind in Abb. 3-3 dargestellt.



**Abb. 3-3 Chromatografische Reinigung von His<sub>6</sub>-mTyr aus *E. coli* KRX**

A) Chromatogramm der IMAC zur Reinigung von His<sub>6</sub>-mTyr. Absorptionssignal bei 280 nm in mAU (schwarz), Leitfähigkeit in mS/cm (blau) und der Elutionsgradient (Puffer B in %) (grün). Puffer A: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl (pH 7,5). Puffer B: 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 1 M Imidazol (pH 7,5). DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, 1 bis 6 – Elutionsfraktionen. B – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der IMAC. M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, 1 bis 6 – Elutionsfraktionen. Es wurden 20 µg vom RE und DL, und 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker aufgetragen. Das Zielprotein His<sub>6</sub>-mTyr ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 37,5 kDa).

Das Chromatogramm zeigt einen typischen Verlauf. Zunächst war ein Anstieg des Absorptionssignals während der Probenauftragung (Durchlauf, DL) zu detektieren. Während des Waschschriffs (Waschfraktion, W) wurden weitere, nicht-bindende Zellbestandteile abgetrennt und das Absorptionssignal sank auf die Basislinie. Mit dem linearen Imidazolgradienten eluierte das Zielprotein, was sich im Peak (Fraktionen 1 – 6) im Chromatogramm zeigte. Die Analyse der Proteinaufarbeitung erfolgte mittels SDS-PAGE. Im SDS-PA-Gel (Abb. 3-3 B) sind zunächst RE (Spur 2) und die unlösliche Fraktion (P, Spur 3) nach dem Zellaufschluss aufgetragen. Die Hälfte von His<sub>6</sub>-mTyr reichte sich in der löslichen Fraktion an. Sowohl im DL (Spur 4), als auch in W (Spur 5) konnten *E. coli* eigene Proteine nachgewiesen werden, die erfolgreich vom Zielprotein abgetrennt wurden. Die Elutionsfraktion 1 (Spur 6) enthält hauptsächlich eine Verunreinigung bei ca. 60 kDa und kein Zielprotein. In den Fraktionen 2 – 6 (Spur 7 – 11) konnte His<sub>6</sub>-mTyr sowie ein paar Verunreinigungen nachgewiesen werden. Anschließend erfolgte die Dialyse (Kap. 2.2.5.1.2, S. 41) der Zielprotein-enthaltenden Elutionsfraktionen 2 – 6 gegen PBS (pH 7,4) bei 4 °C. Insgesamt konnten 496 mg His<sub>6</sub>-mTyr aus *E. coli* KRX zu ausreichender Homogenität (Reinheit > 95 %) aufgereinigt werden, was einer Ausbeute von ~ 21 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>BFM</sub> entspricht. Das gereinigte Zielprotein wurde anschließend in final 50 % (v/v) Glycerin aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.2.1.3 Nachweis der enzymatischen Aktivität

Im Anschluss wurde die Aktivität gereinigter His<sub>6</sub>-mTyr im Vergleich zur kommerziellen Pilz-Tyrosinase (Sigma) mit L-Tyr als Substrat untersucht. Die spezifische Aktivität wurde im Sigma-Assay nach Duckworth *et al.* durch Messung der Absorptionsänderung bei 280 nm bestimmt [Duckworth und Coleman, 1970] (Kap. 3.2.1.3.1, S. 55). Des Weiteren wurde die Aktivität qualitativ über die NBT-Färbung (Nitroblautetrazoliumchlorid) nachgewiesen (Kap. 3.2.1.3.2, S. 57).

#### 3.2.1.3.1 Photometrischer Nachweis der Tyrosinase-Aktivität

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität ( $A_{\text{spez}}$ ) erfolgte durch Messung der Absorptionsänderung bei 280 nm. Als Substrat wurde L-Tyr eingesetzt, welches durch die Tyrosinase zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) umgewandelt wird. Durch die Hydroxylierung nimmt die Absorption bei 280 nm zu. Die Methode ist in Kap. 2.2.6.4.1 (S. 45) detailliert beschrieben. Die spezifische Aktivität der gereinigten His<sub>6</sub>-mTyr wurde mit der der kommerziellen Pilz-Tyrosinase (Sigma) bei 25 °C und 37 °C verglichen. Die Temperatur von 25 °C wird im „Sigma-Assay“ angegeben und als Temperatur-Optimum der Pilz-Tyrosinase beschrieben [Espín *et al.*, 1998]. Des Weiteren werden 25 °C auch standardmäßig zur Hydroxylierung von Muschelfußproteinen (Mfp) eingesetzt [Gim *et al.*, 2008; Hwang *et al.*, 2005; Wang und Scheibel, 2018a]. In den letzten Jahren wurde die Modifikation Mfp-enthaltener Sequenzen mit der Pilz-Tyrosinase jedoch auch bei 37 °C erfolgreich gezeigt [Brennan *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018]. Aus diesem Grund sollten die Reaktionen für beide Temperaturen untersucht werden. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität wurde im „Sigma-Assay“ im Gegensatz zur klassischen Einheit (1 U = 1 µmol/min) folgende Definition einer Unit festgelegt: eine Unit führt zu einem Anstieg bei  $A_{280}$  von 0,001 pro Minute bei 25 °C in einem 3 mL-Reaktionsgemisch mit L-Tyr ( $C_{\text{Reaktion}} = 0,34$  mM). Diese Definition diente als Grundlage zur Berechnung von  $A_{\text{spez}}$  der untersuchten Tyrosinasen. Um die Daten aus der vorliegenden Arbeit mit der Literatur vergleichen zu können, wurde auf eine Umrechnung in µmol/min verzichtet. Zum einen existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben zu den Extinktionskoeffizienten von Tyr und DOPA,

und zum anderen wird im „Sigma-Assay“ die Diphenolaseaktivität der Tyrosinase nicht unterbunden und DOPA kann weiter zu Dopachinon oxidieren (Abb. 2-1, S. 46). Dies wurde in bisherigen Studien unter Verwendung des „Sigma-Assay“ vernachlässigt. Aus diesem Grund erfolgte in den Experimenten zur Modifikation der Designer-Proteine die Zugabe von Ascorbinsäure und Borat im Reaktionsansatz (Kap. 2.2.6.4.2, S. 46), um das Peptid-gebundene DOPA vor weiterer Oxidation zu schützen.

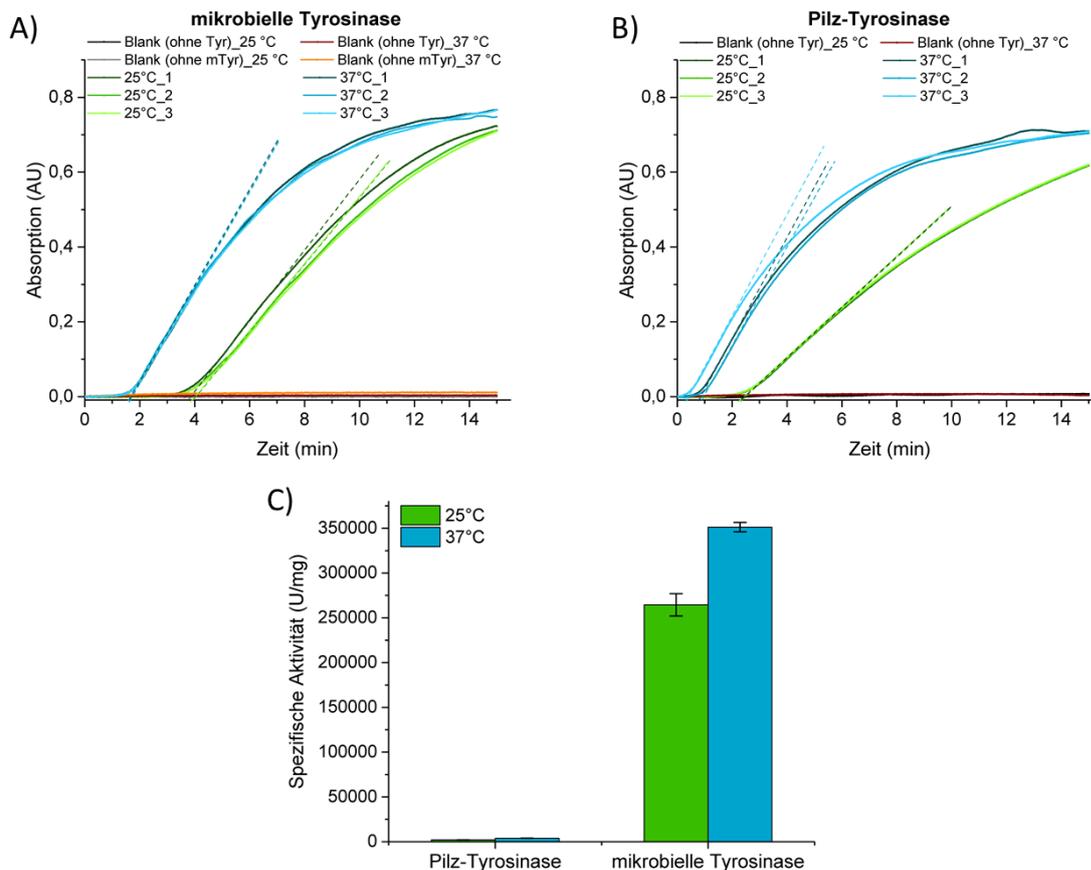
Für den hier verwendeten „Sigma-Assay“ mit Tyr als Substrat, erfolgte die Reaktion in 0,1 M Na-Acetat-Puffer (pH = 5,5) und wurde photometrisch für 15 min verfolgt. Vorversuche bestätigten, dass His<sub>6</sub>-mTyr eine deutlich höhere Aktivität aufwies (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden für eine vergleichende Darstellung 0,61 µg/mL (16,3 nM) His<sub>6</sub>-mTyr bzw. 6,82 µg/mL (57,3 nM) Pilz-Tyrosinase eingesetzt. Die Progresskurven (Abb. 3-4 A, S. 57) zeigen die enzymatischen Reaktionen der His<sub>6</sub>-mTyr vergleichend bei 25 °C (grüne Kurven) und 37 °C (blaue Kurven). Nach einer initialen Lag-Phase, die bei 25 °C ca. 4 min und bei 37 °C ca. 2 min andauerte, nahm die Absorption bei 280 nm zu. Aus den linearen Abschnitten der Progresskurven wurden die Geschwindigkeiten bestimmt (gestrichelte Linien) und zur Berechnung der spezifischen Aktivität eingesetzt. Als Referenzen dienten Reaktionsansätze ohne L-Tyr als Substrat (I) und ohne Enzym (His<sub>6</sub>-mTyr) (II). Diese Reaktionen (Abb. 3-4 A Legende) zeigten keine Veränderung der Absorption bei 280 nm über den gesamten Zeitraum (15 min). Die Progresskurven mit kommerzieller Pilz-Tyrosinase (Abb. 3-4 B, S. 57) zeigen ebenfalls eine initiale Lag-Phase. Der lineare Bereich (gestrichelte Linien) wurde zur Berechnung der spezifischen Aktivität verwendet. Die Ergebnisse zur spezifischen Aktivität der His<sub>6</sub>-mTyr und der Pilz-Tyrosinase bei 25 °C und 37 °C sind vergleichend in Abb. 3-4 C dargestellt. Zusammenfassend sind die Mittelwerte aus den Ergebnissen der drei unabhängigen Messungen sowie deren Standardabweichungen gezeigt (n = 3). Erwartungsgemäß ist die spezifische Aktivität für beide Enzyme bei 37 °C höher als bei 25 °C und folgt dem Prinzip der Arrhenius-Gleichung ( $k = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}}$ ; k – Reaktionsgeschwindigkeitskonstante, E<sub>A</sub> – Aktivierungsenergie, R – universelle Gaskonstante, T – absolute Temperatur) [Lottspeich, 2012]. Vergleicht man die Aktivitäten beider Tyrosinasen wurde für die His<sub>6</sub>-mTyr eine A<sub>spez</sub> (25 °C) mit ca. 264580 U/mg bestimmt, was einer 130-fach höheren Aktivität als der Pilz-Tyrosinase unter den getesteten Reaktionsbedingungen entspricht. Bei 37 °C wurde für die His<sub>6</sub>-mTyr eine A<sub>spez</sub> von 351240 U/mg ermittelt (90-fach höher als die der Pilz-Tyrosinase).

Zusammenfassend zeigte die His<sub>6</sub>-mTyr aus *V. spinosum*, produziert in *E. coli* KRX (Kap. 3.2.1.2, S. 54), sowohl bei 25 °C als auch bei 37 °C unter den getesteten Bedingungen für L-Tyr als Substrat eine höhere spezifische Aktivität (bis zu 130-fach) im Vergleich zur kommerziell erhältlichen Pilz-Tyrosinase (Sigma).

Zusätzlich erfolgten Messungen mit dem proteinogenen Substrat His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (Rekombinante Produktion: Kap. 3.2.2.1, S. 59; Reinigung: Kap. 3.2.2.2, S. 61). Die Änderung in der Absorption bei 280 nm war jedoch kaum detektierbar und flachte nach ca. 1 – 2 min Reaktionszeit ab (Daten nicht gezeigt). Im Allgemeinen war das Signal-Rausch-Verhältnis zu stark und die Messungen lieferten unter den getesteten Bedingungen keine verlässlichen Daten. Als Grund kann zum einen die höhere Molekulare Masse von Proteinen als auch der geringere Anteil an Tyr in Proteinen im Vergleich zum monophenolischen Substrat genannt werden. Bislang sind auch in der Literatur keine Progresskurven und kinetischen Daten für proteinogene Substrate beschrieben.

Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis zur erfolgreichen Modifikation in den Designer-Proteinen in der vorliegenden Arbeit durch den qualitativen Nachweis mittels NBT-Färbung und

Bestimmung des Modifizierungsgrades mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden jeweils im Kapitel „*In vitro* Modifikation mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase“ des zu untersuchten Designer-Proteins gezeigt (Mfp-3: Kap. 3.2.2.3, S. 64; DP1: Kap. 3.2.3.3, S. 80; DP2: Kap. 3.2.4.3, S. 87).



**Abb. 3-4 Nachweis der enzymatischen Aktivität der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) und der Pilz-Tyrosinase im Sigma-Assay**

Progresskurven der Tyrosinase-Reaktionen mit L-Tyr (0,34 mM) als Substrat in 0,1 M Na-Acetat-Puffer (pH = 5,5) vergleichend bei 25 °C (grün) und 37 °C (blau),  $\lambda = 280$  nm,  $t = 15$  min. Die Anstiege (gestrichelte Linien) wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt und für die Berechnung der spezifischen Aktivität genutzt ( $n = 3$ ). Als Kontrollen erfolgten die Reaktionen ohne Tyr als Substrat (bei 25 °C schwarz, 37 °C braun) oder ohne Tyrosinase (bei 25 °C grau, 37 °C orange) im Reaktionsansatz. A – Progresskurven der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) ( $c_{\text{Reaktion}} = 0,61$   $\mu\text{g/mL}$ ), B – Progresskurven der Pilz-Tyrosinase ( $c_{\text{Reaktion}} = 6,82$   $\mu\text{g/mL}$ ). C – Das Säulendiagramm zeigt die resultierende spezifische Aktivität in U/mg der untersuchten Tyrosinasen zu den verschiedenen Temperaturen (25 °C grün; 37 °C blau). Der Versuchsablauf ist Kapitel 2.2.6.4.1 (S. 45) zu entnehmen. Definition: 1 Unit führt zu einem Anstieg bei 280 nm von 0,001 pro Minute in einem 3 mL-Reaktionsgemisch mit L-Tyr (25 °C).

### 3.2.1.3.2 Vorversuch für den qualitativen Nachweis der Tyrosinase-Aktivität für die Substrate L-Tyrosin und His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3

Neben dem photometrischen Nachweis der Tyrosinase-Aktivität (Kap. 3.2.1.3.1, S. 55) wurde die Aktivität qualitativ mit der NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)-Färbung untersucht. Die experimentellen Bedingungen finden sich in Kap. 2.2.6.4.2 (S. 46). In diesem Vorversuch wurden vergleichend die Reaktionen mit der kommerziellen Pilz-Tyrosinase (Sigma) und His<sub>6</sub>-mTyr durchgeführt. Die Modifikationsreaktionen wurden 3 h bei 25 °C und 37 °C untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-5 dargestellt. Als Substrat wurde 0,34 mM L-Tyr (A) und 104  $\mu\text{M}$  His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (B) als Designer-Protein verwendet. Jeweils 5  $\mu\text{L}$  eines Reaktionsansatzes wurden auf die Nitrocellulosemembran aufgetragen. Als Negativkontrolle diente ein

Reaktionsansatz ohne Substrat (-). Unter Verwendung beider Tyrosinasen zeigten die Reaktionen ohne Substrat (-) keine Färbung, während blau-violette Punkte deutlich in allen Proben mit Substrat (+) erkennbar sind. Diese Färbung bestätigte das Vorhandensein von DOPA unter allen getesteten Bedingungen. Das Experiment zeigte, dass sowohl die Pilz-Tyrosinase als auch His<sub>6</sub>-mTyr unter den getesteten Reaktionsbedingungen die Substrate L-Tyr und His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 hydroxyliert haben. Aus diesem Grund eignet sich der Assay für die Reaktionstemperaturen 25 °C und 37 °C, und kann daher als qualitativer Nachweis für DOPA in den DP verwendet werden. Aktive His<sub>6</sub>-mTyr stand somit für die Funktionalisierung der DP bereit.

		A) L-Tyrosin			B) His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3		
Subst.		-	+	+	-	+	+
T (°C)		25	25	37	25	25	37
Tyrosinase	mTyr						
	P.-Tyr						

**Abb. 3-5 NBT-Färbung zum qualitativen Nachweis der Aktivität der Tyrosinasen**

Dargestellt ist der Vergleich der enzymatischen Aktivität zwischen mikrobieller Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) und der kommerziell erworbenen Pilz-Tyrosinase (P.-Tyr) von Sigma bei 25 °C und 37 °C. Als Substrat (Substr.) wurde zum einen 0,34 mM L-Tyr (A) und 104 µM His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (B) als Designer-Protein für die Reaktion eingesetzt. Aufgetragen wurden 5 µL der Reaktionen nach 3 h ohne (-) und mit Substrat (+) im Ansatz. Die NBT-Färbung erfolgte nach Kap. 2.2.6.4.2 (S. 46).

### 3.2.2 His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3

Für die materialwissenschaftlichen Untersuchungen sollten neben den Designer-Proteinen, die eine Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken enthalten, ebenfalls die Eigenschaften der adhäsiven Blöcke alleine untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die Muschelfußproteine-3 (Mfp-3) aus *M. edulis* (Mefp-3) und *M. galloprovincialis* (Mgfp-3) als Einzeldomänen heterolog in *E. coli* produziert und anschließend chromatografisch aufgereinigt. In der Literatur konnte Mgfp-3 (mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-tag) bereits rekombinant aus *E. coli* gewonnen werden und wurde positiv auf adhäsive Eigenschaften getestet [Hwang et al., 2005; Yang et al., 2013]. Die chromatografische Reinigung erfolgte bislang unter denaturierenden Bedingungen und die Ausbeuten waren sehr gering ( $\leq 47$  mg/L<sub>Kultur</sub>). Mefp-3 ist hingegen in der Literatur besser charakterisiert und bildete in den letzten Jahrzehnten die Grundlage für eine detaillierte Charakterisierung als Klebprotein [Even et al., 2008; Hwang und Waite, 2012; Hwang et al., 2010; Papov et al., 1995; Silverman und Roberto, 2007; Waite und Andersen, 1978b], wurde aber noch nicht erfolgreich in einem heterologen Organismus produziert. Die Extraktion von Mefp-3 aus Muschelfüßen ist sehr arbeitsintensiv und man erhält nur geringe Ausbeuten von wenigen mg Protein aus ca. 30 Muschelfüßen [Castillo et al., 2017; Morgan, 1990], was für die Produktion von bio-inspirierten Klebstoffen ungeeignet ist. Eine vielversprechende Alternative bietet daher die rekombinante Produktion in *E. coli*. Aus diesem Grund war ein Vergleich beider Mfp-3 von Interesse, um etwaige sequenzabhängige adhäsive Eigenschaften zu untersuchen.

Im Gegensatz zur Literatur wurden die Mfp-3 als His<sub>6</sub>-SUMO-Fusionsproteine designt (Kap. 3.1.1.1, S. 52). Durch die Fusion mit dem eukaryotischen Protein SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) kann die Löslichkeit sowie die Produktion rekombinanter Proteine erhöht werden [Marblestone et al., 2006]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung des SUMO-tags ist die überhangsfreie Spaltung des tags vom Zielprotein durch eine hochspezifische Protease (ScUlp1),

um einen nativen N-Terminus zu generieren [Butt et al., 2005; Malakhov et al., 2004; Marblestone et al., 2006]. Die Kombination mit dem N-terminalen Hexahistidin-*tag* ermöglicht eine klassische Reinigung der Fusionskonstrukte über Affinitätschromatografie.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse zur heterologen Produktion (Kap. 3.2.2.1, S. 59), der chromatografischen Reinigung über den His<sub>6</sub>-SUMO-*tag* (Kap. 3.2.2.2, S. 60) sowie der *in vitro* Modifikation (Kap. 3.2.2.3, S. 64) beider Mfp-3-Proteine gezeigt.

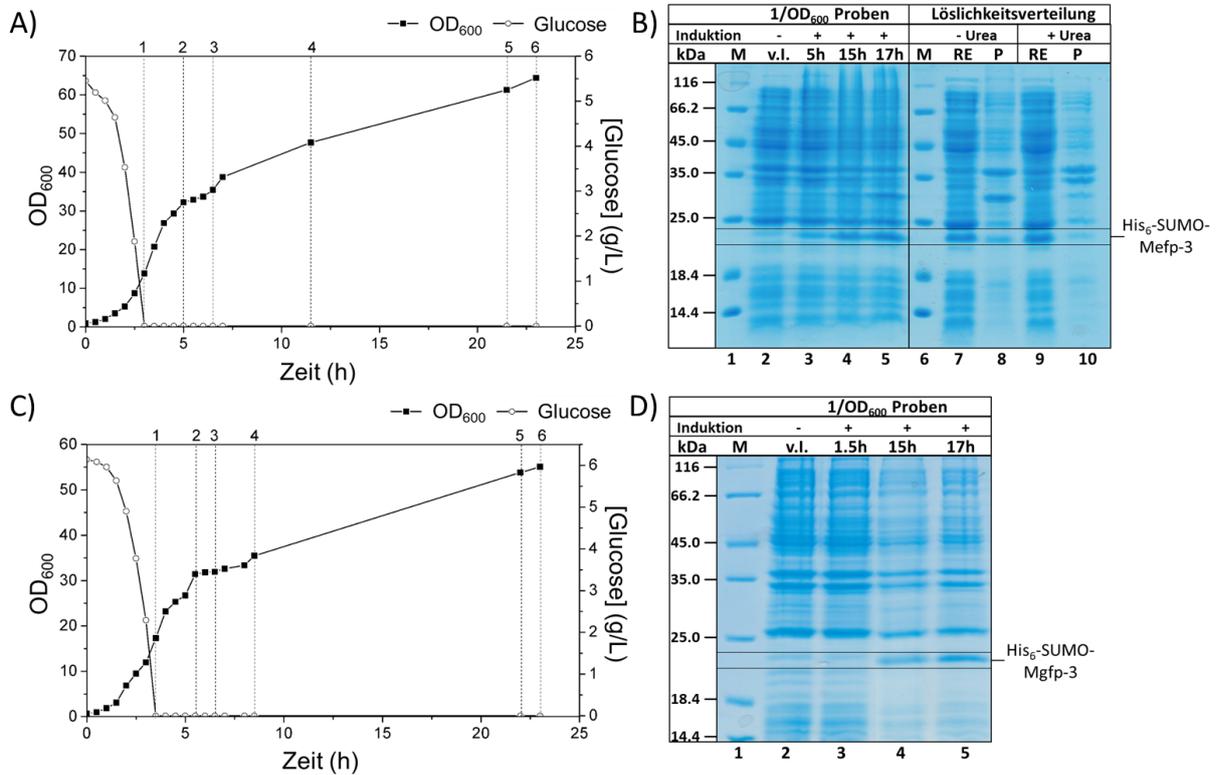
### 3.2.2.1 Heterologe Produktion der Muschelfußproteine-3 im Bioreaktormaßstab

Im Vorfeld wurde eine Klonierung des Mefp-3-Gens aus pJOE\_DP1A und des Mgfp-3-Gens aus pJOE\_DP1B in den Zielvektor pET28a (+) durchgeführt (Kap. 2.2.2.2; S. 33 – 34). Die rekombinante Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS wurde zunächst im Schüttelkolbenmaßstab durchgeführt und die Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Abb. 8-7, S. 175). Zur Gewinnung ausreichender Biomasse für die Proteinaufarbeitung beider Zielproteine erfolgte die Kultivierung von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS im 30 L Bioreaktor. Die Fermentationsbedingungen sind in Kap. 2.2.3.1.2 (S. 37) beschrieben. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Fermentation für beide Zielproteine in Abb. 3-6 dargestellt und verglichen. In Abb. 3-6 A (Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3) und C (Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3) sind die Verläufe der *Offline*-Daten der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) und der Glucosekonzentration gezeigt. Vergleicht man die beiden Prozesse sind das Zellwachstum als auch der Glucoseverbrauch während der Fermentation von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ähnlich. Nach Verbrauch der *Batch*-Glucose (5 g/L) erfolgte die kontinuierliche Zufütterung mit 70 g/h Glycerin (Zeitpunkt 1). Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 32 wurde die Temperatur von 37 °C auf 25 °C reduziert (Zeitpunkt 2), um mit einem Prozess über Nacht insgesamt größere Mengen an Biofeuchtmasse zu generieren und somit die Gesamtausbeute an Zielprotein zu erhöhen [Schein und Noteborn, 1988; Taylor et al., 2017]. Anschließend wurde die Induktion mit 1 mM IPTG nach 1,5 h gestartet und der Feed auf 50 g/h Glycerin herabgesetzt (Zeitpunkt 3), um ein gleichmäßiges kontinuierliches Wachstum über Nacht zu gewährleisten. Nach der Induktion wurden zu zwei weiteren Zeitpunkten 1/OD<sub>600</sub>-Proben entnommen (Zeitpunkt 4 und 5). Die Zellernte erfolgte jeweils nach 17 h Induktion (Zeitpunkt 6). Zur Untersuchung der Plasmidstabilität wurden bei beiden Fermentationen vor Induktion, nach 1,5 h Induktion und zum Zeitpunkt der Ernte (17 h Induktion) Proben entnommen und analysiert. Die Stabilität für beide Plasmide lag zu allen getesteten Zeitpunkten bei 100 % (Daten nicht gezeigt).

Neben der Untersuchung des Wachstumsverhaltens wurde der Erfolg der Fermentationen zur Proteinsynthese von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 mittels SDS-PAGE analysiert. Die SDS-PA-Gele sind in Abb. 3-6 B (His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3) und D (His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3) dargestellt. Anhand der 1/OD<sub>600</sub>-Proben ist zu erkennen, dass die Intensität der Zielproteinbanden während der Induktionsphase (Spur 3 – 5) für His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (ca. 19,2 kDa) und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 (ca. 19 kDa) zunimmt (Durch das SUMO-Protein wird das Migrationsverhalten in der SDS-PAGE beeinflusst [Butt et al., 2005] und die Mfp-3 laufen bei ca. 24 kDa). Vor Induktion (Spur 2) ist keine Bande auf Zielproteinhöhe zu erkennen.

Zusätzlich wurde die Löslichkeitsverteilung der Mfp-3 untersucht und ist im Folgenden beispielhaft für His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 gezeigt. In der Literatur ist der Zellaufschluss sowie die Reinigung von His<sub>6</sub>-Mgfp-3 unter denaturierenden Bedingungen beschrieben, da das Protein ansonsten unlösliche Agglomerate ausbildet und nur die Hälfte von His<sub>6</sub>-Mgfp-3 löslich vorlag [Hwang et al., 2005; Yang et al., 2013]. Durch die Verwendung von Harnstoff im Puffer war es möglich, die unlösliche und lösliche Fraktion zusammen zu reinigen, und so die Ausbeute zu verbessern. Für die weitere Aufarbeitung der His<sub>6</sub>-SUMO-fusionierten Mfp-3 sollte die

Notwendigkeit eines denaturierenden Agens für die Löslichkeit untersucht werden. In Abb. 3-6 B sind der Rohextrakt (RE) und die unlösliche Fraktion (P) nach Zellaufschluss und Zentrifugation aufgetragen. Als Basispuffer wurde ein in der Literatur beschriebener Tris/Natrium-Phosphat-basierter Puffer verwendet (10 mM Tris-HCl, 100 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 8.0). Sowohl mit Harnstoff im Resuspensionspuffer (Spur 9) als auch ohne Harnstoff (Spur 7) lag der Hauptanteil von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 löslich vor.



**Abb. 3-6 Ergebnisse zur heterologen Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS im Bioreaktormaßstab**

A und B – Ergebnisse zur heterologen Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3. C und D – Ergebnisse zur heterologen Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3. A und C – Wachstumskurve und Glucoseverbrauch während der Fermentation von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS unter der getesteten Expressionsbedingung. Zeitpunkte: 1 – Start der kontinuierlichen Zufütterung mit 70 g/h (Glycerin), 2 – Reduktion der Temperatur von 37 °C auf 25 °C, 3 – Induktion mit 1 mM IPTG, 4 und 5 – 1/OD Probennahme, 6 – 1/OD Probennahme 17 h und Zellernte. B und D – 12,5 %ige SDS-PA-Gele der 1/OD<sub>600</sub>-Proben vor und nach den verschiedenen Induktionszeiten (0 h – 17 h). Zusätzlich ist in B die Löslichkeitsverteilung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 mit und ohne Urea im Resuspensionspuffer (50 mM Na-phosphat, 150 mM NaCl, ± 6 M Urea; pH 7,5) gezeigt: RE – Rohextrakt/Lösliche Fraktion, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet. Aufgetragen wurden 10 µL der 1/OD Proben, 20 µg RE und 5 µL Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). Die Zielproteine sind gekennzeichnet: His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (theoretisches Molekulargewicht: 19,2 kDa) und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 (theoretisches Molekulargewicht: 19 kDa). Durch den SUMO-Anteil verändert sich das Laufverhalten beider Zielproteine in der SDS-PAGE auf ca. 24 kDa.

Sowohl His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 als auch His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 konnten erfolgreich in der löslichen Zellfraktion von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS produziert werden. Die Ergebnisse der Fermentation sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst. Aus den Prozessen konnte nach Abtrennung des Fermentationsüberstandes jeweils ca. 1 kg Biofeuchtmasse (BFM) gewonnen werden, welche als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Untersuchungen zur Reinigung der Proteine diente (Kap.3.2.2.2, S. 61).

**Tabelle 3-2** Resultate der heterologen Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS im 30 L Bioreaktor

Zielprotein	V <sub>Start</sub> (L)	V <sub>Final</sub> (L)	Finale OD <sub>600</sub>	BFM (kg)
His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3	7,5	9,4	64,4	1,15
His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3	7,5	9,0	53,5	0,98

### 3.2.2.2 Proteinaufarbeitung

#### 3.2.2.2.1 Chromatografische Proteinreinigung

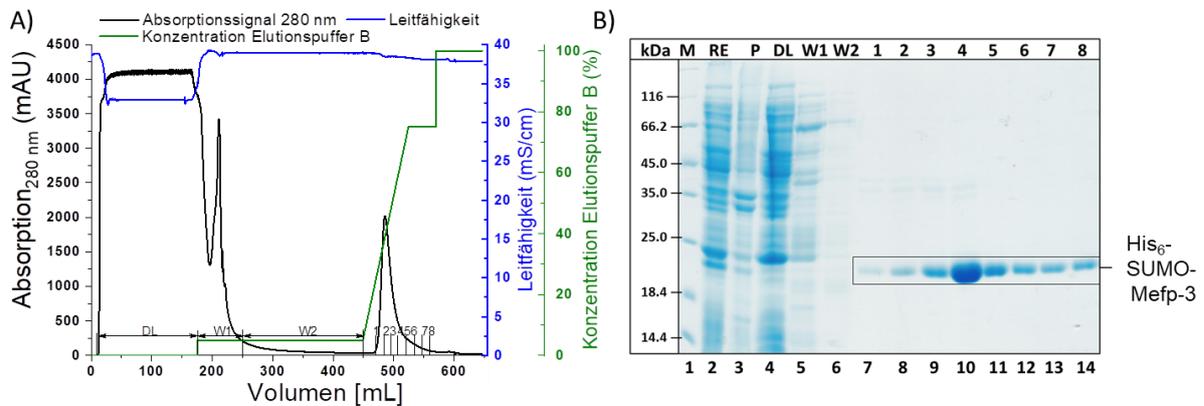
Die Aufarbeitung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 erfolgte mittels Affinitätschromatografie über den N-terminalen His<sub>6</sub>-tag. Zunächst wurde die Aufreinigung im 1 mL-Maßstab untersucht, um die Notwendigkeit einer IMAC unter denaturierenden Bedingungen nach Literaturangaben zu prüfen [Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005; Yang et al., 2013]. Dieser Vorversuch zeigte, dass für die Reinigung beider His<sub>6</sub>-SUMO-Fusionsproteine keine denaturierenden Bedingungen (Zugabe von Harnstoff) erforderlich sind und dieselben Mengen an Zielprotein isoliert werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Anschließend erfolgte die Übertragung auf einen größeren Maßstab (Kap. 2.2.5.1.1, S. 40). Es wurden jeweils ca. 200 g BFM aufgeschlossen. In dem größeren Ansatz erfolgte die Elution der Zielproteine entsprechend den Ergebnissen im kleinen Maßstab mit 750 mM Imidazol im Puffer B. Im Folgenden werden die Ergebnisse exemplarisch für die Aufreinigung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 gezeigt. Die chromatografische Aufarbeitung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 verlief entsprechend und die Ergebnisse sind dem Anhang (Kap. 8.2, Abb. 8-8, S. 176) zu entnehmen.

Das Chromatogramm als auch die SDS-PAGE-Analyse (Kap. 2.2.4.1, S. 39) der Reinigung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 sind in Abb. 3-7 dargestellt. Die Elution des Zielproteins erfolgte erwartungsgemäß im linearen Gradienten (Abb. 3-7 A, Fraktionen 1 – 8). Das SDS-PAGE-Gel in Abb. 3-7 B zeigt, dass nach Zellaufschluss und Zentrifugation der Hauptanteil von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 in löslicher Form vorlag (Spur 2). Sowohl im Durchlauf (Spur 4), als auch in den Waschfraktionen 1 (Spur 5) und 2 (Spur 6) konnten Verunreinigungen erfolgreich abgetrennt werden. Die SDS-PAGE-Analyse der Elutionsfraktionen 1 – 8 (Spur 7 – 14) zeigt deutlich, dass der Hauptanteil von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 in den Elutionsfraktionen in reiner Form vorlag.

Anschließend erfolgte die Dialyse der Zielprotein-enthaltenen Elutionsfraktionen gegen Puffer A, um für die anschließende enzymatische Abspaltung des His<sub>6</sub>-SUMO-tags (Kap. 3.2.2.2.2, S. 62) das Imidazol in der Probe zu entfernen. Nach Dialyse waren Präzipitate im Dialyseschlauch sichtbar. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass es sich um die Zielproteine handelte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund erfolgte eine Anpassung der Dialysedauer von ca. 16 h (ü.N.) bei 4 °C zu zweimal 1 h bei 4 °C. Dadurch waren kaum Präzipitate nach Dialyse nachzuweisen und die Ausbeuten konnten beispielsweise für His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 von 1,44 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>BFM</sub> auf 1,97 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>BFM</sub> erhöht werden (Tabelle 3-3, S. 62). In Abb. 3-8 A+B (S. 63) Spur 1 sind die Zielproteine nach Dialyse aufgetragen. Die gereinigten Zielproteine wurden anschließend in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei - 80 °C gelagert. Die Reinigungen von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 wurden mehrfach durchgeführt, um ausreichende Mengen für die materialwissenschaftlichen Untersuchungen (Kap. 3.3.3, S. 109) bereitzustellen. Im Mittel wurden aus jeweils 0,2 kg BFM *E. coli* BL21 (DE3) pLysS ~ 410 mg His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und ~ 850 mg His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 aufgereinigt. Zusammenfassend sind die Ergebnisse aller Aufarbeitungen in Tabelle 3-3 dargestellt. Die Ausbeuten beider Zielproteine konnten durch die Einführung eines zusätzlichen

Waschrittes (7 CV mit 5 % Puffer B) in den nachfolgenden Reinigungen verbessert werden (Tabelle 3-3; His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3: Experiment 2 zu 3/4; His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3: Experiment 1 zu 2).



**Abb. 3-7 Chromatografische Reinigung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS**

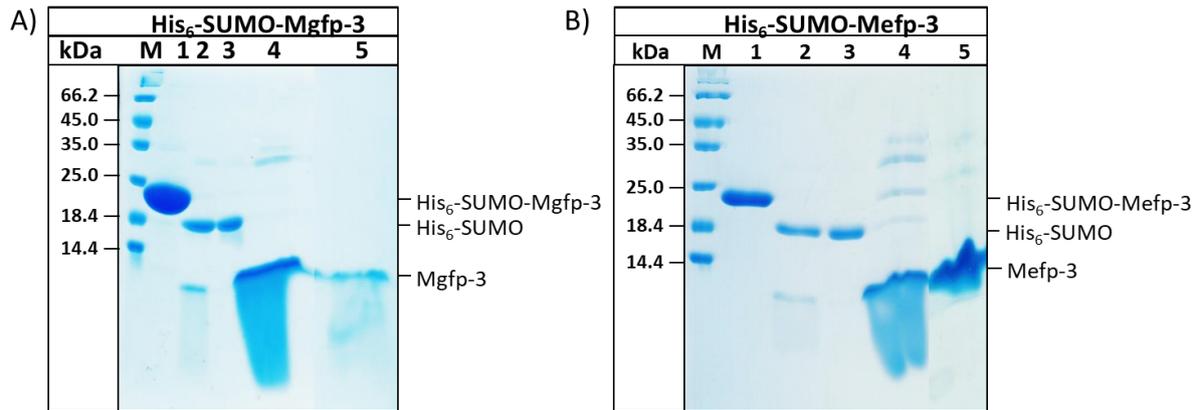
A) Chromatogramm der IMAC zur Reinigung der His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3. Absorptionssignal bei 280 nm in mAU (schwarz), Leitfähigkeit in mS/cm (blau) und der Elutionsgradient (Puffer B in %) (grün). Puffer A: 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl (pH 8,0). Puffer B: 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol (pH 8,0). DL – Durchlauf, W1 – Waschfraktion 1, W2 – Waschfraktion 2, 1 bis 8 – Elutionsfraktionen. B – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der IMAC. M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, DL – Durchlauf, W1 – Waschfraktion 1, W2 – Waschfraktion 2, 1 bis 8 – Elutionsfraktionen. Es wurden 20 µg vom RE und DL, und 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific) aufgetragen. Das Zielprotein His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 19,2 kDa). Durch den SUMO-Anteil verändert sich das Laufverhalten in der SDS-PAGE auf ca. 24 kDa.

**Tabelle 3-3 Resultate aller chromatografischen Reinigungen von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 aus ca. 200 g *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Ausbeuten bezogen auf die Proteinmenge pro eingesetztem Gramm Biofeuchtmasse (BFM).**

Zielprotein	Experiment	Eingesetzte BFM (g)	Gesamtproteinmenge nach Reinigung (mg)	Protein-ausbeute (mg <sub>Protein</sub> /g <sub>BFM</sub> )
His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3	1	212,0	304,8	1,44
	2	201,6	396,7	1,97
	3	194,0	448,9	2,30
	4	208,5	507,9	2,40
His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3	1	200,0	740,0	3,70
	2	205,3	963,4	4,70

### 3.2.2.2.2 Enzymatische Abspaltung des His<sub>6</sub>-SUMO-tags

Im Anschluss an die chromatografische Reinigung der His<sub>6</sub>-SUMO-Mfp-3 erfolgte der Verdau mit Hilfe der aktiven Domäne der SUMO-Protease 1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScUlp1) (Kap. 2.2.5.1.1.1, S. 41). ScUlp1 wurde aus *E. coli* Zellen entsprechend der Literatur gereinigt [Thümmel, 2018]. In Vorversuchen mit His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 zeigte sich, dass das Mefp-3 Protein nach Abspaltung des His<sub>6</sub>-SUMO-tags vollständig als Präzipitat vorlag (Daten nicht gezeigt). Der SUMO-tag trägt somit maßgeblich zur Löslichkeit von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 bei.



**Abb. 3-8 Enzymatische Abspaltung des His<sub>6</sub>-SUMO-tags der Mfp3-Fusionsproteine**

16 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben vor und nach dem enzymatischen Verdau mit der SUMO-Protease in 0, M Na-Acetatpuffer (pH 5,5) für 2 h bei 30 °C. A) SUMO-Protease Verdau von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3, B) SUMO-Protease Verdau von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3. M – Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), 1 – His-SUMO-Mfp-3 / Probe vor Reaktion, 2 – Gemisch nach SUMO-Protease Verdau, 3 – Überstand nach Zentrifugation (enthält His<sub>6</sub>-SUMO-Protein), 4 – Unlösliche Fraktion nach Zentrifugation (enthält Mfp-3), 5 – Resolubilisiertes / lösliches Mfp-3 in 25 % HAc. Es wurden 5 µg Protein und 5 µL Marker aufgetragen. Die Proteine sind entsprechend gekennzeichnet: His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 (19 kDa), His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (19,2 kDa), His<sub>6</sub>-SUMO (13,4 kDa), Mgfp-3 (5,58 kDa), Mefp-3 (5,83 kDa). Durch den SUMO-Anteil verändert sich das Laufverhalten beider Zielproteine in der SDS-PAGE auf ca. 24 kDa.

*In vivo* liegen Mfp in den Muschelsekretionsdrüsen bei einem pH von 5,5 vor [Yu et al., 2011a]. Aus diesem Grund und basierend auf Literaturprotokollen, die die Löslichkeit der Mfp im sauren Milieu beschreiben, wurden Versuche zur SUMO-Abspaltung bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Zudem war die *in vitro* Modifikation mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) bei pH 5,5 geplant (Kap. 3.2.2.3, S. 64). Beide Reaktionen im gleichen Puffer durchführen zu können, wäre somit von Vorteil. Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass die SUMO-Protease unter den getesteten Bedingungen bei pH 5,5 noch vollständig aktiv ist, Mefp-3 verblieb allerdings unlöslich. Aus diesem Grund wurden verschiedene Puffer und Lösungsmittel zur Solubilisierung getestet (Daten nicht gezeigt). Final konnten Mefp-3 und Mgfp-3 nach SUMO-Abspaltung in 25 % Essigsäure (HAc) in Lösung gebracht werden. ScUlp1 wurde in einem molaren Verhältnis von 1:1000 eingesetzt. Abb. 3-8 zeigt das Ergebnis des Verdaus von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 (A) und His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (B) bei pH 5,5. In Spur 1 ist das Fusionsprotein nach chromatografischer Reinigung und Lagerung bei -80 °C vor dem SUMO-Protease Verdau auf einer Höhe von ca. 24 kDa zu sehen. Nach dem Verdau bei 30 °C für 2 h sind zwei distinkte Banden für das His<sub>6</sub>-SUMO-Protein und für Mgfp-3 (A) / Mefp-3 (B) zu erkennen. Zusätzlich war nach der Protease-Reaktion eine Trübung des Proteingemisches zu beobachten. Aus diesem Grund erfolgte im Anschluss eine Zentrifugation. Im Überstand (V<sub>x</sub>) konnte His<sub>6</sub>-SUMO nachgewiesen werden (Spur 3) und Mgfp-3 (A) bzw. Mefp-3 (B) verblieben im Pellet (Spur 4). Die Pellets beider Mfp-3 konnten im gleichen Volumen (wie V<sub>x</sub>) in 25 % HAc resolubilisiert werden und nach erneuter Zentrifugation waren Mgfp-3 (A) und Mefp-3 (B) im Überstand nachweisbar (Spur 5), aber ein kleines Pellet verblieb. Aufgrund der Essigsäure in den Proben in Spur 4 und 5 wurde das Laufverhalten der Proteine durch die Änderung des pH-Wertes in der SDS-PAGE beeinflusst. Aus diesem Grund erscheinen die Proteinbanden der Mfp-3 diffus. Die Probe des verbliebenen Pellets zeigte keine Proteinbanden in der SDS-PAGE (Daten nicht gezeigt). Versuche dieses resultierende Pellet der zweiten Zentrifugation wieder in Lösung zu bringen, um die Proteinausbeute zu erhöhen, zeigten dass weder 25 %

HAc noch andere Lösungsmittel (50 % HAc, dH<sub>2</sub>O, 8 M Harnstoff + 5 % HAc und 25/50/75 % ACN in Wasser + 0,1 % TFA) die Präzipitate auflösen konnten (Daten nicht gezeigt). Aus unterschiedlichen Präparationen konnten im Mittel 0,22 mg<sub>Mfp-3</sub>/mg<sub>Fusionsprotein</sub> gewonnen werden. Unter Berücksichtigung des His<sub>6</sub>-SUMO-Anteils im Fusionskonstrukt entspricht dies einer Ausbeute von ~ 74 %.

Nach den Untersuchungen zum SUMO-Protease-Verdau der Mfp-3-Fusionsproteine konnte ein schnelles und effizientes Protokoll zur His<sub>6</sub>-SUMO-Abspaltung sowie Abtrennung des His<sub>6</sub>-SUMO-Anteils im löslichen Überstand nach Zentrifugation etabliert werden. Die Experimente zeigten, dass der His<sub>6</sub>-SUMO-*tag* maßgeblich zur Löslichkeit der Mfp-3 im wässrigen Milieu *in vivo* und *in vitro* beiträgt. Im Anschluss an den Verdau konnten die Mfp-3 zum großen Anteil in 25 % HAc resolubilisiert werden. Zur weiteren Lagerung wurden die Proteinlösungen auf 5 % HAc verdünnt und anschließend lyophilisiert. Der weiße Proteinpuder (Probe nicht-modifizierte Mfp-3) wurde bis zur funktionellen Charakterisierung (Kap. 3.3, S. 90) bei - 20 °C gelagert.

### 3.2.2.3 *In vitro* Modifikation der gereinigten Mfp-3

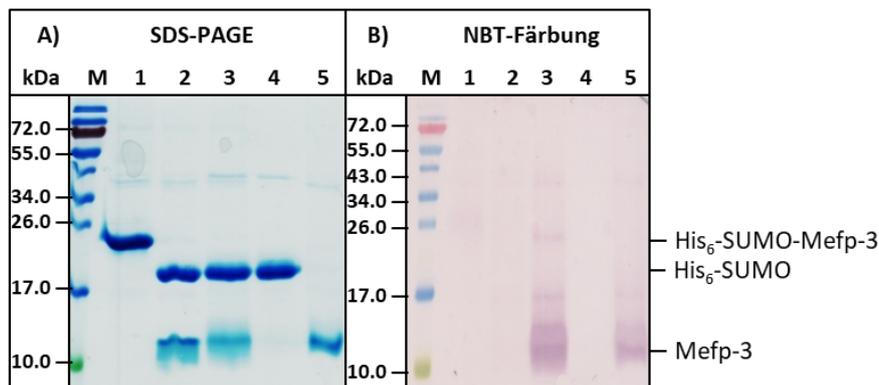
Für die Bereitstellung der modifizierten Proteinvarianten sollten Mefp-3 und Mgf-3 mit der in Kap. 3.2.1.2 (S. 54) rekombinant hergestellten mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) funktionalisiert werden. Durch die enzymatische Reaktion der His<sub>6</sub>-mTyr sollten Peptid-gebundene Tyr zu DOPA hydroxyliert werden. DOPA-enhaltene Proteine werden in der Literatur als Schlüsselmolekül für die Klebeeigenschaften mariner Organismen beschrieben [Deming, 1999; Lee et al., 2011]. Demnach ist ein Nachweis einer erfolgreichen *in vitro* Modifikation der Tyr zu DOPA in den Mfp-3-Sequenzen mit His<sub>6</sub>-mTyr notwendig. Der qualitative Nachweis erfolgte mittels NBT-Färbung (Kap. 3.2.2.3.1, S. 64). Zudem wurde die Anzahl an Hydroxylierungen in den Proteinen quantitativ mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse (Kap. 3.2.2.3.2, S. 65) analysiert. Die Ergebnisse beider Analysemethoden sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

#### 3.2.2.3.1 *In vitro* Modifikation und qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung

Zur Optimierung des Aufarbeitungs- und Modifikationsprozesses der Mfp-3 wurde ein effektives Protokoll entworfen bei dem die Abspaltung des His<sub>6</sub>-SUMO-*tags* und die Hydroxylierung sukzessive im gleichen Reaktionsansatz abliefen. Damit sollte eine effektivere Modifikation der Mfp-3 ermöglicht werden. Die *one-pot*-Reaktion wurde wie folgt durchgeführt: 1 – SUMO-Protease-Verdau (Enzym im molaren Verhältnis von 1:1000) für 2 h bei 30 °C in 100 mM Na-Acetat-Puffer (pH 5,5); 2 – Tyrosinase-Reaktion für 5 h bei 25 °C in 100 mM Na-acetat, 25 mM Ascorbinsäure, 20 mM Na-Borat, 2 µM CuSO<sub>4</sub> (pH 5,5), 50 µg/mL His<sub>6</sub>-mTyr, 0,3 mg/mL Mfp-3.

In Abb. 3-9 A ist das SDS-PAGE-Gel der *one-pot* Reaktion beispielhaft für das Fusionskonstrukt His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 zu sehen und in B die entsprechenden Proben im NBT-gefärbten (Kap. 2.2.6.4.2, S. 46) Western-Blot (WB) zum qualitativen Nachweis von DOPA in der Polypeptidkette. In Spur 1 ist zunächst His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 nach chromatografischer Reinigung (Kap. 3.2.2.2.1, S. 61) und Lagerung bei - 80 °C vor dem SUMO-Protease Verdau aufgetragen. Wie erwartet, ist die Proteinbande in der Coomassiefärbung deutlich erkennbar und die NBT-Färbung ist negativ. Nach dem Verdau mit der SUMO-Protease bei 30 °C für 2 h (Spur 2) sind zwei Banden für das His<sub>6</sub>-SUMO-Protein und für Mefp-3 nach Coomassiefärbung zu erkennen (A). Auch für diese Probe zeigt sich kein NBT-Signal (B). Zum Reaktionsgemisch wurden nun die Komponenten der His<sub>6</sub>-mTyr-Reaktion gegeben und die Modifikation gestartet. Nach 5 h wurde die Reaktion beendet und eine Probe entnommen (Spur 3). Die Bande von

Mefp-3 scheint in der SDS-PAGE etwas diffuser (A). Im NBT-gefärbten WB ist eindeutig DOPA nachweisbar (B, Spur 3). Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch bei 60000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, um das SUMO-Protein, ScUlp1 und die His<sub>6</sub>-mTyr (Überstand, A, Spur 4) vom Zielprotein Mefp-3 (Pellet) zu trennen. Im SUMO-Protein befindet sich ein Tyr, welches potenziell von der His<sub>6</sub>-mTyr zu DOPA hydroxyliert werden könnte. In der NBT-Färbung (B) ist jedoch in Spur 4 kein positives Signal zu erkennen. In His<sub>6</sub>-SUMO als auch in den Enzymen ScUlp1 und His<sub>6</sub>-mTyr konnten somit keine nachweisbaren Hydroxylierungen detektiert werden. Daher ist davon auszugehen, dass His<sub>6</sub>-SUMO und ScUlp1 als auch His<sub>6</sub>-mTyr selbst vermutlich keine Substrate der His<sub>6</sub>-mTyr sind. Modifiziertes Mefp-3 wurde über Nacht für 16 h in 50 % HAc bei 4 °C resolubilisiert. Nach Zentrifugation befand sich der Hauptanteil des Zielproteins im Überstand (Spur 5), wenngleich ein kleines Pellet nicht vollständig in Lösung gebracht werden konnte. Die NBT-Färbung des Überstandes war wie erwartet positiv (B, Spur 5). Zur Optimierung des elektrophoretischen Laufverhaltens der mod. Mfp-3 in 25 % HAc (starke diffuse Banden in Abb. 3-8, S. 63) wurden verschiedene Experimente zur Probenaufarbeitung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es zeigte sich, dass das Proben-Pufferverhältnis (von 1:1 zu 1:5) die Diffusität reduzieren konnte und zu einem homogeneren Laufverhalten der mod. Mfp-3 führte (Abb. 3-9 A, Spur 5).



**Abb. 3-9 Enzymatische Abspaltung am Beispiel von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und *in vitro* DOPA-Modifikation von Mefp-3 mit His<sub>6</sub>-mTyr**

SDS-PAGE Analyse (A) und NBT-gefärbter Western-Blot (B) vor und nach enzymatischen Verdau von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 mit der SUMO-Protease für 2 h bei 30 °C und Modifikation von Mefp-3 mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) bei 25 °C für 5 h. 1 – His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 vor SUMO-Abspaltung, 2 – Nach SUMO-Protease Verdau & vor His<sub>6</sub>-mTyr Reaktion, 3 – Nach Reaktion mit His<sub>6</sub>-mTyr, 4 – Überstand nach Zentrifugation (enthält His<sub>6</sub>-SUMO & His<sub>6</sub>-mTyr), 5 – Resolubilisiertes Pellet nach Zentrifugation in 50 % HAc (enthält modifiziertes Mefp-3). Aufgetragen wurden 3 µg Protein 5 µL Marker (M, PPL *Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific). Die Proteine sind entsprechend gekennzeichnet: His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (19,2 kDa), His<sub>6</sub>-SUMO (13,4 kDa) und Mefp-3 (5,83 kDa). Durch den SUMO-Anteil verändert sich das Laufverhalten beider Zielproteine in der SDS-PAGE auf ca. 24 kDa.

Die Zielprotein-enthaltene Proteinlösung wurde auf 5 % HAc verdünnt und lyophilisiert. Das Lyophilisat war braun und klebrig und wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Für das Fusionskonstrukt His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 wurden vergleichbare Resultate in der *one-pot* Reaktion erzielt (Kap. 8.2, Abb. 8-9, S.177). Insgesamt konnten aus den verschiedenen Präparationen 0,16 mg<sub>mod. Mfp-3</sub>/mg<sub>Fusionsprotein</sub> gewonnen werden. Dies entspricht unter Berücksichtigung des His<sub>6</sub>-SUMO-Anteils im Fusionskonstrukt einer Ausbeute von ~54 % (*m/m*).

### 3.2.2.3.2 Bestimmung des Modifizierungsgrades mittels Massenspektrometrie

Für die Bestimmung des Modifizierungsgrades von Tyr zu DOPA in der Polypeptidkette wurde eine MALDI-TOF/TOF MS-Analyse durchgeführt (Kap. 8.1.2.1.1.2, S. 169). Zunächst wurde die Anzahl an Hydroxylierungen im Fusionsprotein His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 untersucht. Die durchschnittliche Masse des Zielproteins beträgt 19098,10 Da und jede Hydroxylierung führt zu einer zusätzlichen Masse von ~ 16 Da. Das Fusionsprotein enthält 11 Tyr (inklusive 1 Tyr im SUMO-Protein), die potenzielle Hydroxylierungsstellen für die mikrobielle Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) darstellen. In den Experimenten in Kap. 3.2.2.3.1 (Abb. 3-9, S. 65, Spur 4) zum qualitativen Nachweis von DOPA war für His<sub>6</sub>-SUMO (1 Tyr) kein sichtbares Signal detektierbar. Bei der massenspektrometrischen Analyse der modifizierten Probe wurde eine Masse von 19259,74 Da nachgewiesen, was ca. zehn Hydroxylierungen entspricht. Die Ergebnisse der Messung sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.1.2, Abb. 8-2, S. 171).

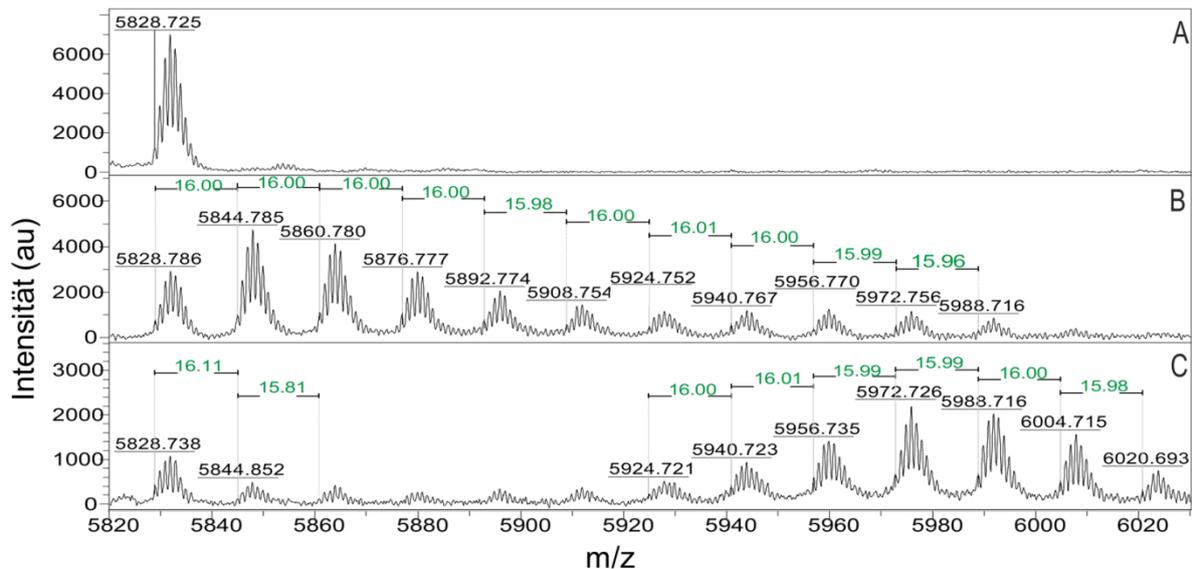
**N – ADYYGPNYGP<sup>Y</sup>PRRYGGGN<sup>Y</sup>NR<sup>Y</sup>NR<sup>Y</sup>GRRYGGYK<sup>Y</sup>GW<sup>Y</sup>NNGW<sup>Y</sup>NR<sup>Y</sup>GRRGKY<sup>Y</sup>W – C**

<sup>Y</sup> – Potenzielle Hydroxylierungsstelle

**Abb. 3-10 Aminosäuresequenz von Mefp-3 mit den potenziellen Hydroxylierungsstellen für die Modifikation durch His<sub>6</sub>-mTyr (<sup>Y</sup>)**

Im Anschluss sollte die Anzahl an Hydroxylierungen in Mefp-3 nach SUMO-Abspaltung und Modifikationsreaktion bestimmt werden. Zum Vergleich wurde eine Probe unmod. Mefp-3 nach SUMO-Abspaltung ebenfalls analysiert und es konnte, wie zu erwarten, eine mono-isotopische Masse von 5828,73 Da nachgewiesen werden (Abb. 3-11 A, S. 67). Zusätzlich konnte im ISD-Fragmentspektrum die vollständige Sequenz von Mefp-3 (Abb. 3-10) bestätigt werden. Die Ergebnisse der ISD-Analyse sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 11, Abb. 11-5 und Tabelle 11-1).

Es folgte die MALDI-TOF/TOF MS-Analyse von mod. Mefp-3 nach der enzymatischen Hydroxylierungsreaktion. Wie in Kap. 3.2.2.3.1 (S. 64) beschrieben, liegt mod. Mefp-3 nach der Reaktion mit His<sub>6</sub>-mTyr anteilig in 25 % HAc löslich und unlöslich vor. Beide Spezies wurden mittels MS analysiert und werden im Folgenden „mod. Mefp-3 (löslich)“ und „mod. Mefp-3 (Pellet)“ benannt. In der Probe „mod. Mefp-3 (löslich)“ (Abb. 3-11 B) konnten Spezies mit 1 – 10 zusätzlichen OH-Resten nachgewiesen werden, wobei die Signalintensität mit zunehmender Anzahl an Hydroxylierungen abnimmt. Die Massenzunahme um ca. 16 Da ist entsprechend gekennzeichnet (grün). Somit liegt ein Proteingemisch von mod. Mefp-3 vor und der Hauptanteil ist ein- bis vierfach hydroxyliert. Die Pelletprobe wurde in Vorbereitung auf die MS-Analyse für 12 h in 5 M GdmCl inkubiert. Das Pellet konnte vollständig gelöst werden und die Lösung zeigte eine dunkelbraune Färbung, die für hydroxyliertes Mefp-3 charakteristisch ist. In der Probe „mod. Mefp-3 (Pellet)“ (Abb. 3-11 C) wurden interessanterweise vermehrt Spezies mit einer höheren Anzahl an Hydroxylierungen (6 – 10) detektiert. Zudem konnten zwei weitere Massen mit einer Massenzunahme um 16 Da nachgewiesen werden. Da in der Sequenz von Mefp-3 nur zehn potenzielle Hydroxylierungsstellen für die His<sub>6</sub>-mTyr vorkommen, ist davon auszugehen, dass einige DOPA-Seitenketten erneut hydroxyliert wurden. Bei dieser Reaktion entsteht 3,4,5-Trihydroxyphenylalanin (TOPA). TOPA konnte bereits in einem synthetisch hergestellten Decapeptid (AKPSYHypHypTYK) nach Inkubation mit der kommerziellen Pilz-Tyrosinase (Sigma) nachgewiesen werden [Burzio und Waite, 2002]. Diese Hypothese der Ausbildung von TOPA innerhalb von Mefp-3 konnte jedoch im Rahmen der Arbeit nicht experimentell bestätigt werden. Der Nachweis der mehrfachen hydroxylierten Proteinspezies in „mod. Mefp-3 (Pellet)“ (Abb. 3-11 C) erklärt das verstärkte Koazervationsverhalten. Je mehr DOPA in Mefp-3 enthalten ist, desto stärkere Interaktionen kann es eingehen.



**Abb. 3-11 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse von Mefp-3 vor und nach der Reaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) zur Bestimmung des DOPA-Gehalts**

MALDI-TOF/TOF-Massenspektren der nicht-modifizierten und modifizierten Mefp-3 Proben nach chromatografischer Auftrennung mittels HPLC (Kap. 8.1.2.1.1.1, S. 168) zur Auftrennung der unterschiedlich stark modifizierten Proteinspezies. Im Anschluss erfolgte die MALDI-TOF/TOF MS-Analyse („Dried-droplet“-Präparation mit 65 % DHB-Matrix, Reflektormodus) (Kap. 8.1.2.1.1.2, S. 169). A – nicht-mod. Mefp-3 (vor der Modifikationsreaktion), B – mod. Mefp-3 (löslich), C – mod. Mefp-3 (Pellet). Jede Hydroxylierung eines Tyr führt zu Massenzunahme von ~ 16 Da (Kennzeichnung in grün). Nicht-mod. Mefp-3 besitzt eine monoisotopische Masse von 5827,76 Da.

Fazit: Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass nach der Modifikationsreaktion mit der His<sub>6</sub>-mTyr verschieden stark hydroxylierte Proteinspezies von Mefp-3 generiert wurden. Im löslichen Anteil von mod. Mefp-3 (Abb. 3-11 B, S. 67) konnten 1 – 10 zusätzliche OH-Reste nachgewiesen werden. Anhand der Ergebnisse ist nicht auszuschließen, dass auch trihydroxylierte Produkte entstanden sein könnten. In der Literatur konnten bislang nur 30 % (Pilz-Tyrosinase, Sigma) [Hwang et al., 2007] – 53 % (mikrobielle Tyrosinase) [Do et al., 2017] DOPA in *in vitro* modifizierten Muschelfuß-basierten Proteinen nachgewiesen werden. Aus den Literaturdaten ist jedoch nicht ersichtlich, ob es sich um ein Gemisch unterschiedlichen Hydroxylierungsgrades handelt oder ein Tyr an Position x mehrfach hydroxyliert wurde (TOPA). Eine detaillierte Analyse der Proteoformen nach Hydroxylierungsreaktion Mfp-basierter Sequenzen ist bislang nicht in der Literatur gezeigt. Für die weitere funktionelle Charakterisierung und die optimale Bindung der Mfp-3 an die Zieloberfläche SiO<sub>2</sub> in den materialwissenschaftlichen Untersuchungen (Kap. 3.3, S. 90), wurde der lösliche Anteil verwendet. Die löslichen Mfp-3 gewährleisten eine gute Adhäsion, während Mfp-3 im Pellet durch das Vorhandensein von Spezies mit einer höheren Anzahl an Hydroxylierungen verstärkt intra- und intermolekulare Wechselwirkungen (kohäsive Kräfte) ausbilden.

### 3.2.3 Designer-Protein 1A/B – Variante

Im Anschluss an die Aufarbeitung und Modifikation der adhäsiven Einzelblöcke (Kap. 3.2.2, S. 58) werden in diesem Kapitel die Ergebnisse der Designer-Proteine (DP) DP1A und DP1B vorgestellt. Diese bestehen aus einer Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken, die bereits in Kap. 3.1.1.2 (S. 52) vorgestellt wurden. Der kohäsive Block in DP1A/B besteht aus ELP-Sequenzen basierend auf der Arbeit von [Desai et al., 2016]. Als adhäsive Einheit enthält DP1A das Muschelfußprotein-3 aus *M. edulis* (Mefp-3) und DP1B, das

homologe Protein aus *M. galloprovincialis* (Mgfp-3). DP1A und DP1B wurden, wie die adhäsiven Einzelblöcke als His<sub>6</sub>-SUMO-Fusionsproteine designt. Die Fusion soll wie bereits beschrieben die Löslichkeit sowie die Produktion der rekombinanten Proteine positiv beeinflussen.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse von DP1A/B zur heterologen Produktion in *E. coli* (Kap. 3.2.3.1, S. 68), der chromatografischen Reinigung über den His<sub>6</sub>-SUMO-tag (Kap. 3.2.3.2.1, S. 70), der Reinigung mittels Hitzefällung (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74) sowie der *in vitro* Modifikation mit der mikrobiellen Tyrosinase (Kap. 3.2.3.3, S. 80) gezeigt.

### 3.2.3.1 Heterologe Produktion in *E. coli*

#### 3.2.3.1.1 Heterologe Produktion im Schüttelkolbenmaßstab

Die experimentellen Bedingungen zur Gensynthese, Klonierung und zur Expression finden sich im Kapitel Material und Methoden (Kap. 2.2.2.1, S. 33; Kap. 2.2.3.1, S. 36). Die generierten Expressionsplasmide wurden wie folgt bezeichnet (Tabelle 2-5, S. 28): pJOE\_DP1A (mit Gensequenz des Mefp-3 aus *M. edulis*) und pJOE\_DP1B (mit Gensequenz des Mgfp-3 aus *M. galloprovincialis*).

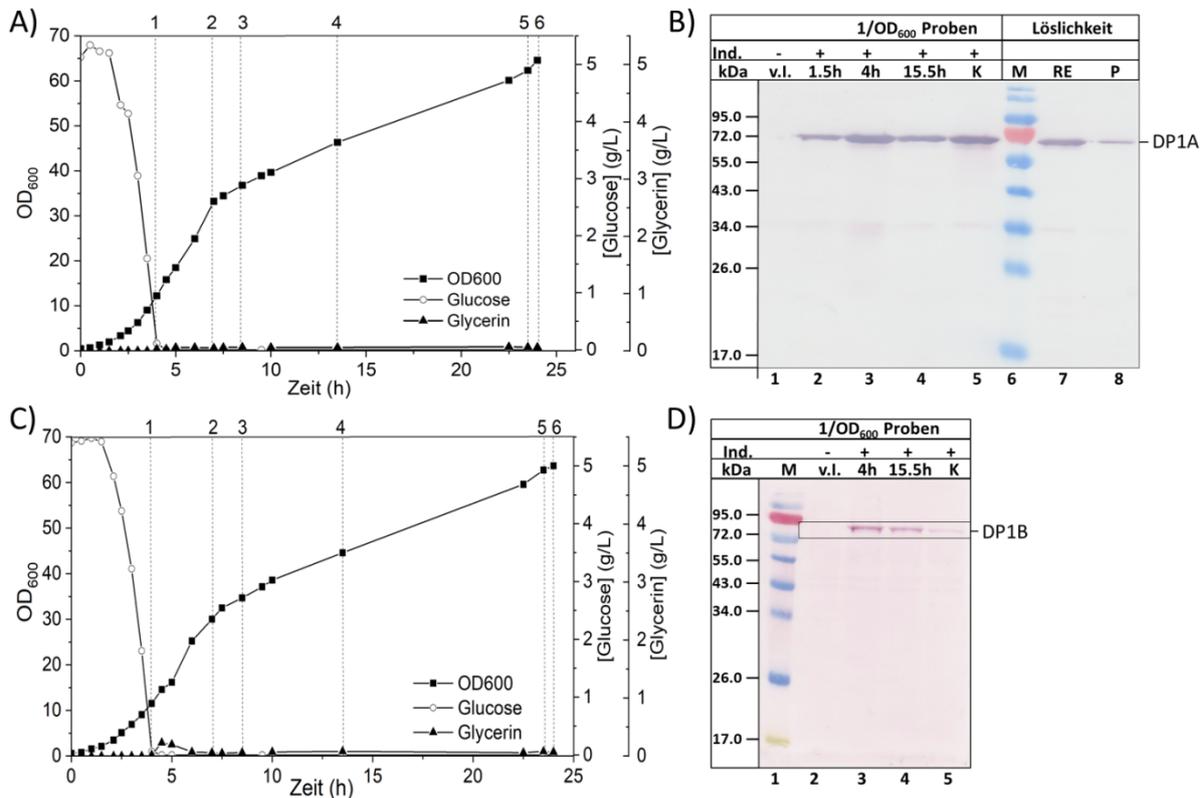
Im Anschluss an die Etablierung der Induktions- und Produktionsbedingungen von DP1A/B erfolgte die Kultivierung von *E. coli* BW3110 unter folgenden Bedingungen: 100 mL TB-Medium, Induktion mit 5 mM L-Rhamnose,  $T_{\text{vor}}$  Induktion = 37 °C,  $T_{\text{Induktion}}$  = 25 °C,  $t$  = 22 h. Die Reduktion der Temperatur zum Zeitpunkt der Induktion war notwendig, um die Ausbildung von intra- und intermolekularen  $\beta$ -Helix-Strukturen durch die ELP-Domäne in den Zielproteinen während der Produktion zu vermeiden. In der SDS-PAGE-Analyse der 1/OD<sub>600</sub>-Proben war für beide Zielproteine erst zum Zeitpunkt der Ernte nach 22 h Induktion mit 5 mM Rhamnose eine Expressionsbande detektierbar (Kap. 8.2, Abb. 8-10 A, S. 177, DP1A: Spur 6, DP1B: Spur 10). Durch das zu Grunde liegende positiv regulierte Expressionssystem wurde eine Basalexpression ohne Induktor vermieden. DP1A/B laufen etwas höher als ihr theoretisches MW, was auf den ELP-Teil zurückzuführen ist. Dies wurde bereits in der Literatur für ELP- enthaltene Proteinsequenzen beschrieben [McPherson et al., 1996]. Zusammenfassend waren die Experimente zur Produktion von DP1A/B in TB-Medium erfolgreich und zeigten, dass sich der Hauptanteil der Zielproteine in der löslichen Zellfraktion anreicherte (Kap. 8.2, Abb. 8-10 B, S. 177, DP1A: Spur 3, DP1B: Spur 7).

#### 3.2.3.1.2 Heterologe Produktion in *E. coli* im Bioreaktormaßstab

Zur Bereitstellung von ausreichenden Mengen für die materialwissenschaftlichen Untersuchungen (Kap. 3.3, S. 90) erfolgte die Produktion von DP1A und DP1B im 15 L Maßstab in *E. coli* BW3110 basierend auf den Ergebnissen im Schüttelkolbenmaßstab (SK) (Kap. 3.2.3.1.1, S. 68). Die Fermentationsbedingungen sind in Kap. 2.2.3.1.2 (S. 37) beschrieben.

In Abb. 3-12 A (Produktion von DP1A) und C (Produktion von DP1B) sind die Verläufe der *Offline*-Daten der optischen Dichte (OD<sub>600</sub>), der Glucosekonzentration sowie der Glycerinkonzentration gezeigt. Vergleicht man die beiden Prozesse sind das Zellwachstum, der Glucoseverbrauch und die Glycerinkonzentration während der Fermentation von *E. coli* BW3110 ähnlich. Nach Verbrauch der *Batch*-Glucose (5 g/L) erfolgte die kontinuierliche Zufütterung mit 140 g/h Glycerin (Zeitpunkt 1). Bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 30 wurde die Temperatur von 37 °C auf 25 °C reduziert und der Feed auf 100 g/h Glycerin herabgesetzt (Zeitpunkt 2), um ein kontinuierliches Wachstum über die Nacht zu gewährleisten. Zur Kontrolle wurden die

Glycerinkonzentrationen mit dem *Glycerol Assay Kit* der Firma Megazyme diskontinuierlich verfolgt. Die Ergebnisse dieser Messungen in Abb. 3-12 A und C zeigen, dass die Glycerinkonzentration während des gesamten Prozesses konstant (ca. 0,06 g/L) blieb. 30 min nach Temperatursenkung wurde die Proteinexpression durch Zugabe von L-Rhamnose (Endkonzentration 5 mM, Zeitpunkt 3) induziert. Nach einer Induktionszeit von 15,5 h erreichte die optische Dichte in beiden Prozessen einen Wert von ca. 64 und die Fermentationen wurden beendet (Zeitpunkt 6).



**Abb. 3-12 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP1A und DP1B *E. coli* BW3110 im 15 L Bioreaktormaßstab**

A und B – Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP1A. C und D – Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP1B. A und C – Wachstumskurve, Glucoseverbrauch und Glycerinkonzentration während der Fermentation von *E. coli* BW3110 unter der getesteten Expressionsbedingung. Zeitpunkte: 1 – Start der kontinuierlichen Zufütterung mit 140 g/h (Glycerin), 2 – Reduktion der Temperatur von 37 °C auf 25 °C, Herabsetzen der Zufütterung mit Glycerin auf 100 g/h, 3 – Induktion mit 5 mM Rhamnose, 4 und 5 – 1/OD Probenahme, 6 – 1/OD Probenahme 15,5 h und Zellernte. B und D – Western-Blots der 1/OD<sub>600</sub>-Proben vor und nach den verschiedenen Induktionszeiten (0 h – 15,5 h) sowie die Kontrolle (K, 1/OD-Probe zum Zeitpunkt der Zellernte der jeweiligen SK-Kultivierung). Zusätzlich ist in B die Löslichkeitsverteilung von DP1A im Resuspensionspuffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 1 mM PMSF; pH 8.0) gezeigt: RE – Rohextrakt/Lösliche Fraktion, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet. Aufgetragen wurden 10 µL der 1/OD-Proben, 20 µg RE und 5 µL Marker (M, PPL, *Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific). Die Zielproteine DP1A und DP1B sind gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht DP1A: 57,9 kDa; DP1B: 57,4 kDa). Die Plasmidstabilität von pJOE\_DP1A und pJOE\_DP1B in *E. coli* BW3110 wurde zu folgenden Zeitpunkten überprüft: vor Induktion, 1,5 h Induktion und Ernte. Über den gesamten Kultivierungszeitraum lag diese bei 100 % (Daten nicht gezeigt).

Der Proteinnachweis der Zielproteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot. Anhand der 1/OD<sub>600</sub>-Proben in der WB-Analyse ist zu erkennen, dass DP1A/B bereits nach 1,5 h und auch zum Endpunkt der Kultivierung nachweisbar waren (Abb. 3-12 B: DP1A, D: DP1B). Vor Induktion ist jeweils keine Bande auf der Höhe der Zielproteine zu erkennen. Als Positivkontrolle (K) wurden die 1/OD<sub>600</sub>-Proben zum Zeitpunkt der Ernte aus den SK-Versuchen aufgetragen. Für DP1A zeigt die Kontrolle (Abb. 3-12 B, Spur 5) eine vergleichbare

Bandenintensität. Im Gegensatz dazu konnte die Produktion von DP1B (Abb. 3-12 D, Spur 4) während der Fermentation im Gegensatz zur SK-Kultivierung (Abb. 3-12 D, Spur 5) erhöht werden. Für die folgenden Experimente zur Reinigung von DP1A/B (Kap. 0, S. 70) wurde die Löslichkeit beider Proteine untersucht. Als Resuspensionspuffer wurde ein in der Literatur beschriebener Tris/Natrium-Phosphat-basierter Puffer eingesetzt (10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 1 mM PMSF; pH 8.0), der für die chromatografische Reinigung vom Muschelfußprotein-3 aus *M. galloprovincialis* (Mgfp-3) verwendet wurde [Hwang et al., 2005] und auch für die Reinigung ELP-enthaltener Zielproteine mittels *Inverse transition cycling* beschrieben ist [Meyer und Chilkoti, 2002] (Kap. 3.2.2.2.1, S. 61). Nach Zellaufschluss und Zentrifugation erfolgte die Analyse des Rohextraktes (RE) und der unlöslichen Fraktion (P) mittels SDS-PAGE. Die Untersuchung der Löslichkeitsverteilung ergab, dass sich der Hauptanteil von DP1A/B in der löslichen Zellfraktion anreicherte. Die Analyse ist beispielhaft für DP1A gezeigt (Abb. 3-12 B, Spur 7).

Zusammenfassend war die Produktion von DP1A und DP1B in *E. coli* BW3110 erfolgreich. Die Ergebnisse der Fermentationen sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst. Nach Abtrennung des Fermentationsüberstandes wurden ca. 2 kg BFM gewonnen.

**Tabelle 3-4 Resultate der heterologen Produktion von DP1A und DP1B in *E. coli* BW3110 im 30 L Bioreaktor**

Zielprotein	V <sub>Start</sub> (L)	V <sub>Final</sub> (L)	Finale optische Dichte (OD <sub>600</sub> )	BFM (kg)
DP1A	15	17	64,6	2,1
DP1B	15	18	63,7	2,3

### 3.2.3.2 Reinigung der DP1-Proteine

Die Etablierung einer Reinigungsstrategie für die Designer-Proteine 1A/B (DP1A enthält die Mfp-3 Sequenz aus *M. edulis* und DP1B enthält die Mfp-3 Sequenz aus *M. galloprovincialis*) erfolgte parallel aus rekombinanten *E. coli* Zellen (Kap. 3.2.3.1.2, S. 68). Die Muschelfußproteine-3 aus *M. galloprovincialis* (Mgfp-3) und *M. edulis* (Mefp-3) weisen eine Ähnlichkeit von 58,3 % (Abb. 1-9, S. 15) auf. Mefp-3 wurde bislang nicht rekombinant produziert. Die Isolierung des nativen Proteins aus *M. edulis* bildete jedoch in den letzten Jahrzehnten die Grundlage für eine detaillierte Charakterisierung von Mefp-3 als Klebeprotein [Even et al., 2008; Florioli et al., 2000; Hwang und Waite, 2012; Papov et al., 1995; Waite und Andersen, 1978a]. Anhand der zugrunde liegenden Proteinsequenz und dem Sequenzvergleich beider Mfp-3 war nicht von einem unterschiedlichen Reinigungsverhalten auszugehen. Sequenzspezifische Unterschiede, insbesondere aufgrund von Anzahl und Anordnung der Tyr, sind eher in den materialwissenschaftlichen Untersuchungen zu erwarten.

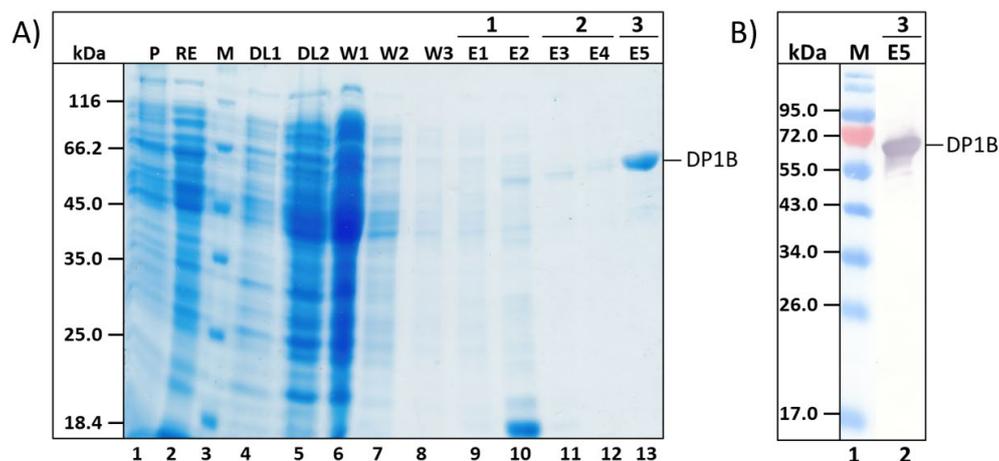
In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse von zwei unterschiedlichen Reinigungsmethoden vorgestellt: die chromatografische Reinigung mittels IMAC (Kap. 3.2.3.2.1, S. 70) und das *Inverse transition cycling* (ITC) (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74), bei dem der reversible Temperaturübergang des ELP-Blocks genutzt wird. Beispielhaft werden Resultate für DP1A oder DP1B gezeigt. Die Aufarbeitungen waren unabhängig von der Reinigungsmethode für beide DP1 vergleichbar.

#### 3.2.3.2.1 Chromatografische Aufarbeitung der DP1-Proteine

Zu Beginn erfolgte die Aufarbeitung von DP1A/B mittels Affinitätschromatografie über den N-terminalen His<sub>6</sub>-SUMO-tag im kleinen Maßstab mittels His<sub>6</sub>-Gravity-Columns (CV = 1 mL, Kap. 3.2.3.2.1.1, S. 71), gefolgt von einer Maßstabsvergrößerung auf eine Chromatografie-säule mit einem Säulenvolumen von 11,5 mL für ein ÄKTA pure System (Kap. 3.2.3.2.1.2, S. 72).

#### 3.2.3.2.1.1 Proteinreinigung im 1 mL Maßstab

Die experimentellen Bedingungen sind in Kap. 2.2.5.1.3 (S. 42) beschrieben. Als Puffer wurde ein Tris/Natrium-Phosphat-basierter Puffer (pH 8,0) verwendet, der in der Literatur zur chromatografischen Reinigung von Mgf<sub>3</sub> beschrieben ist [Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005]. Für die Reinigung von ELP-Sequenzen wird in der Literatur ebenfalls ein Tris- oder Natrium-Phosphat-basierter Puffer empfohlen [Meyer und Chilkoti, 2002]. Die Elution erfolgte in drei Schritten: 500 mM Imidazol (1), 1 M Imidazol (2) und 1 M Imidazol + 6 M Harnstoff (3).



**Abb. 3-13 Chromatografische Reinigung von DP1B aus *E. coli* BW3110**

A – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungs-verlauf der IMAC (His-Gravi-Traps, GE Healthcare). M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, E1 bis E5 – Elutionsfraktionen. Schritte der Elution: 1 – 500 mM Imidazol, 2 – 1 M Imidazol, 3 – 1 M Imidazol + 6 M Harnstoff. Es wurden 20 µg vom RE und DL, und 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker aufgetragen. Das Zielprotein DP1B ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 57,4 kDa). B – Western-Blot der finalen Elutionsfraktion E5. Marker (M, PPL, *Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific).

Im SDS-PA-Gel (Abb. 3-13 A) sind zunächst die Proben nach Zellaufschluss und Zentrifuga-tion zur Abtrennung der Zelltrümmer (Spur 1) gezeigt. Das Zielprotein liegt zum Hauptanteil in der löslichen Fraktion (Spur 2) vor. In den Proben der Durchläufe (Spur 4 + 5) und der Wasch-fraktionen (Spur 6 – 8) konnten erfolgreich Verunreinigungen abgetrennt werden. Im ersten Schritt der Elution mit 500 mM Imidazol ließ sich ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 18 kDa (Spur 10) nachweisen. Mit 1 M Imidazol (Elutionsschritt 2) sind geringe Mengen an DP1B in den Fraktionen E3 (Spur 11) und E4 (Spur 12) detektierbar. Der Hauptanteil von DP1B konnte im 3. Schritt (1 M Imidazol + 6 M Harnstoff, Spur 13) eluiert werden. Das Resultat dieses Experiments zeigte, dass die Bindung von DP1B an das Chromatografiematerial nicht nur auf dem His<sub>6</sub>-SUMO-tag beruht, sondern auch auf den hydrophoben Interaktionen mit der Säulenmatrix (Ni(II)-Sepharose 6 *fast flow*). Da Mefp-3 dieses Verhalten nicht zeigte (Kap. 3.2.2.2, S. 61), sind diese Wechselwirkungen auf die ELP-Domäne in DP1B zurückzu-führen. In Abb. 3-13 B ist die Western-Blot-Analyse des gereinigten DP1B (Spur 2) gezeigt. Aus diesem Ansatz konnten 0,56 mg reines DP1B aus 5 g BFM gewonnen werden.

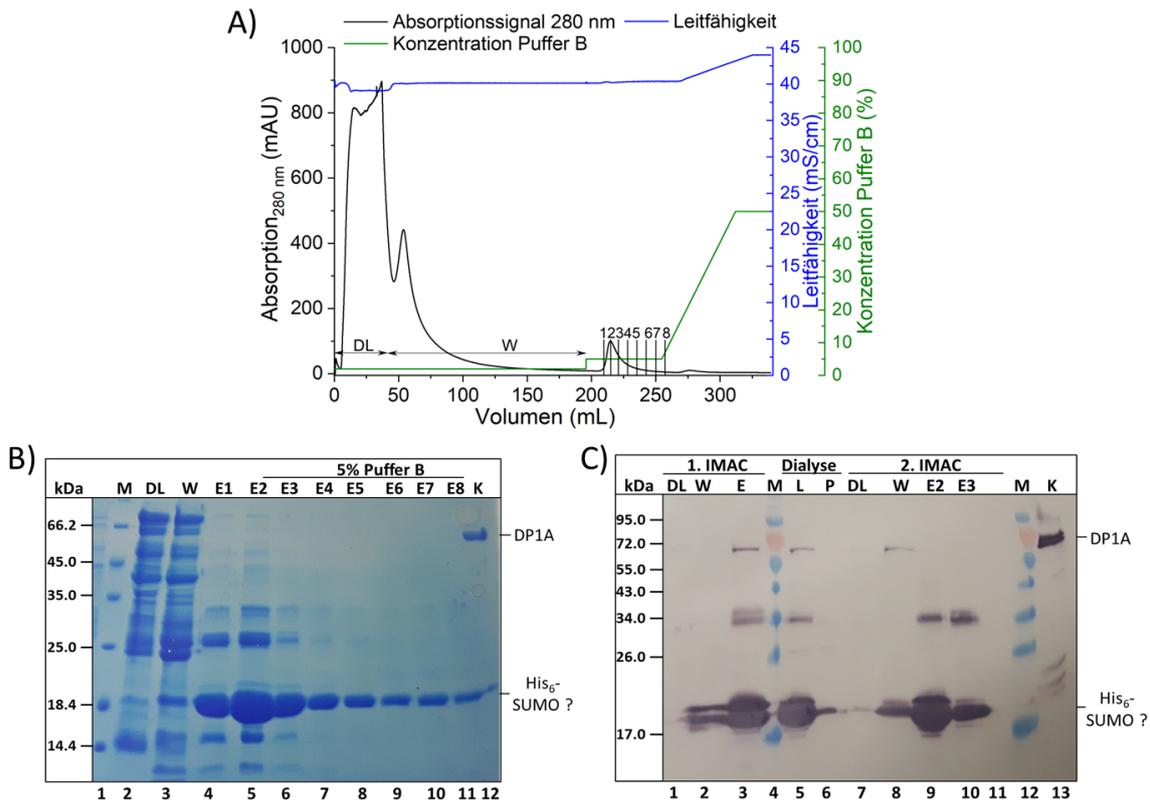
Zusammenfassend war die Reinigung von DP1B mittels Affinitätschromatografie im kleinen Maßstab erfolgreich. Zur Proteinidentifizierung wurde die Gelbande der Elutionsfraktion 5 (Abb. 3-13, Spur 13) massenspektrometrisch untersucht. Die ESI-MS/MS-Analysen wurden von Frau Dr. Schierhorn (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle) durchgeführt. Zum Vergleich erfolgte der Verdau zum einen mit Trypsin als auch mit einem Gemisch aus Trypsin und Chymotrypsin zur Generierung unterschiedlicher Peptidfragmente. Es konnten 16 sequenzspezifische Peptide aus dem tryptischen Verdau (Kap. 8.1.3, Abb. 8-5, S. 173 und Tabelle 8-5, S. 173) und 15 sequenzspezifische Peptide von DP1B aus dem Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin (Kap. 8.1.3, Abb. 8-6, S. 174 und Tabelle 8-6, S. 174) nachgewiesen werden. Die chromatografische Reinigung mittels IMAC von DP1B erwies sich somit als erfolgreich. Vergleichend erfolgte die chromatografische Reinigung zur Reinigung von DP1A. Die Ergebnisse dieser Experimente sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Abb. 8-11, S. 178). Aus diesen Untersuchungen zeigte sich, dass der Hauptanteil von DP1A ebenfalls erfolgreich im 3. Schritt (1 M Imidazol + 6 M Harnstoff) eluiert werden konnte. Unterschiede in der Aminosäuresequenz der beiden DP1-Proteine, haben demnach keinen Einfluss auf das Elutionsverhalten während der Affinitätschromatografie. Mittels MALDI-TOF-TOF MS-Analyse wurde die *Intact mass* der Elutionsfraktion 3 bestimmt. Es konnten insgesamt drei verschiedene Ladungszustände des Proteins mit einer durchschnittlichen Masse von 57804,6 Da in dem aufgenommenen Massenspektrum beobachtet werden (Kap. 8.1.2, Abb. 8-3, S. 171). Die intakte Masse des einfach geladenen Molekül-Ions von DP1A konnte im Massenspektrum bei  $m/z$  von 57649,7 Da nachgewiesen werden, welche nur eine geringe Abweichung zur theoretischen monoisotopischen Masse von 57692,36 Da aufweist. Somit wurde auch DP1A in der finalen Probe (Kap. 8.1.2, Abb. 8-3, S. 171, Spur 8) nach der chromatografischen Reinigung erfolgreich mittels MS nachgewiesen. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Übertragung auf einen größeren Maßstab zur chromatografischen Reinigung von DP1 an einem ÄKTA pure System (Kap. 3.2.3.2.1.2).

#### 3.2.3.2.1.2 Proteinreinigung von DP1A im präparativen Maßstab mittels Chromatographie (CV = 11,5 mL)

Im Anschluss an die Etablierung der chromatografischen Reinigung von DP1A/B im 1 mL Maßstab erfolgte eine Maßstabsvergrößerung zur Reinigung von DP1A an einem ÄKTA pure System. 192,5 g der *E. coli* Biofeuchtmasse wurden mechanisch aufgeschlossen (Kap. 2.2.3.2.1, S. 38) und nach Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde der Rohextrakt (RE) auf eine Ni(II)-Sephacel-Säule (CV = 11,5 mL) aufgetragen.

Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten unter Verwendung der *His-Gravity-Columns* (Kap. 3.2.3.2.1.1, S. 71), in denen der Hauptanteil der DP1 erst mit 1 M Imidazol und 6 M Harnstoff im Puffer eluiert wurde, erfolgte die Elution des Zielproteins in dem größeren Ansatz bereits mit einer geringeren Konzentration an Imidazol (500 mM). Zu dem unerwarteten Elutionsverhalten zeigten sich in der SDS-PAGE starke Verunreinigungen (Anhang, Abb. 8-12, S. 178). Die Elutionsfraktionen E3 – E5 (Abb. 8-12 B, S. 178) der 1. IMAC wurden vereint. Es erfolgte eine Dialyse in Puffer A ohne Imidazol und die Probe wurde auf eine 2. IMAC (Ni(II)-Sephacel, CV = 11,5 mL) aufgetragen. Nach einem 2. Waschschriff mit 5 % Puffer B sollte die Elution in einem linearen Gradienten (50 % Puffer B) erfolgen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-14 dargestellt. Im Chromatogramm zeigte sich, dass ein Hauptpeak bereits bei 5 % Puffer B ( $\approx$  250 mM Imidazol) eluierte (Abb. 3-14 A). Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert und sind in Abb. 3-14 B gezeigt. Es war keine Proteinbande auf der erwartenden Höhe von DP1A ersichtlich. Allerdings konnten intensive Banden verschiedenen Molekulargewichts,

insbesondere bei ca. 19 kDa in allen Elutionsfraktionen (Spur 4 – 11) detektiert werden. Anhand der Größe könnte es sich um ein Proteinfragment mit His<sub>6</sub>-SUMO-Anteil handeln. Als Kontrolle (Spur 12) wurde die Elutionsprobe aus der Reinigung im kleinen Maßstab (His-Spin-Traps) vergleichend mit aufgetragen. Die Western-Blot-Analyse ausgewählter Proben der Aufarbeitung sollte einen besseren Einblick in die Beschaffenheit der Proteine während der chromatografischen Reinigung geben. Das Ergebnis in Abb. 3-14 C zeigt, dass das Zielprotein nach der 1. IMAC nahezu vollständig abgebaut wurde. In den vereinten Elutionsfraktionen (Spur 3) waren nur noch Spuren von intaktem DP1A nachzuweisen. Nach der Dialyse verblieb der Hauptanteil der DP1A-Fragmente in der löslichen Fraktion (Spur 5) und eluierte mit 5 % Puffer B in der 2. IMAC (Spur 9 und 10).



**Abb. 3-14 Untersuchungen zur chromatografischen Reinigung (2. IMAC) von DP1A**

A) Chromatogramm der 2. IMAC zur Reinigung von DP1A. Absorptionssignal bei 280 nm in mAU (schwarz), Leitfähigkeit in mS/cm (blau) und der Elutionsgradient (Puffer B in %) (grün). Puffer: A – 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl (pH 8,0); B – 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol (pH 8,0). DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, 1 bis 8 – Elutionsfraktionen. B) 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der 2. IMAC. M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, E1 bis E8 – Elutionsfraktionen, K – Kontrolle, Gereinigtes DP1A aus der Reinigung im kleinen Maßstab (His-Spin-Traps). Auftragung: 20 µg DL, 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker. C) Western-Blot Analyse nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der 1. und 2. IMAC. M - Marker (PPL, *Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific), L – Lösliche Fraktion nach Dialyse und Zentrifugation, P – Unlösliche Fraktion nach Dialyse und Zentrifugation, E2 – E3 – Elutionsfraktionen 2 und 3 der 2. IMAC. Auftragung: 20 µg DL, 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker. Das Zielprotein DP1A ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 57,9 kDa).

Aus diesem Experiment lässt sich ableiten, dass DP1A während der chromatografischen Reinigung so fragmentiert wurde, dass kein vollständiges Zielprotein mehr vorhanden war. In anschließenden Experimenten zur Proteinstabilität zeigte sich, dass die Verweildauer im RE

einen Einfluss auf die Stabilität von DP1A und DP1B hat (Daten nicht gezeigt). Dadurch ließen sich zunächst die unterschiedlichen Ergebnisse der Vorversuche zur Reinigung (Aufarbeitung aus 1,5 g BFM, Abb. 3-13, S. 71) und dem Hauptversuch (Aufarbeitung aus 192,5 g BFM, Abb. 3-14) erklären. Da der Zeitraum von Zellaufschluss bis zur Beladung der Ni(II)-Sepharose-Säule im größeren Maßstab deutlich zunimmt (wenige Minuten bis mehrere Stunden), unterlag DP1A möglicherweise einem Abbau durch Proteasen. Dieses Ergebnis war aus zwei Gründen unerwartet. Zum einen wurde beim Protein-Design auf die Vermeidung von Proteaseschnittstellen (für die Arbeit in *E. coli*) geachtet und zum anderen wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (cOComplete™, EDTA-frei, Roche) verwendet und bis zur Auftragung auf die IMAC auf Eis gearbeitet.

Da für die geplanten materialwissenschaftlichen Untersuchungen (Kap. 3.3, S. 90) und die Testung der Bindeeigenschaften die intakten Designer-Proteine mit der Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Sequenzblöcken getestet werden sollten, wurde eine Vielzahl von Experimenten durchgeführt, um eine Lösung für diese Abbauproblematik von DP1A/B zu finden. Dafür wurden verschiedene Ansätze getestet, wie die Untersuchung verschiedener Protease-Inhibitoren: PMSF [Brungardt et al., 2020], cOComplete™ Protease Inhibitor Cocktail von Roche [Nallamsetty und Waugh, 2007], Protease Inhibitor Mix III von Genaxxon [Genaxxon, 2015], 1 M KCl [Ayyash et al., 2013], sowie der Aufschluss und die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen (Harnstoff und Guanidiniumchlorid) [Haneskog, 2006]. Die Ergebnisse dieser Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen. Die Zugabe von 1 M Kaliumchlorid zur Inhibierung von Proteaseaktivität während des Zellaufschlusses zeigte das beste Ergebnis. Die Zielproteine DP1A/B waren im Rohextrakt unter Verwendung eines Puffers mit der entsprechenden KCl-Konzentration bis zu 24 h auf Eis stabil. Dieses Resultat deutet auf proteolytischen Abbau des Zielproteins hin. Dennoch kam es unter Verwendung von KCl in den Puffern auch während der chromatografischen Reinigung zum Abbau von DP1A/B. Trotz verschiedener weiterer Versuche konnte die Fragmentierung im Verlauf der Proteinaufarbeitung unter verschiedenen Bedingungen mittels Chromatografie und Dialyse nicht vollständig unterbunden werden. Auch eine umfangreiche massenspektrometrische Analyse konnte keine Aufklärung des Abbaus erbringen. Zusätzlich erfolgten Untersuchungen zur Hitzefällung und Aceton-Extraktion als alternative Aufarbeitungsmethoden zur Vermeidung des Abbaus. Jedoch führten diese Experimente auch nicht zur Gewinnung von Vollängen-DP1A (Daten nicht gezeigt).

Da die Fragmentierung der DP1 während der chromatografischen Reinigung im größeren Maßstab im Rahmen dieser Arbeit nicht unterbunden werden konnte, wurde im Anschluss das *Inverse transition cycling* (ITC) als Methode untersucht (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74).

#### 3.2.3.2.2 Reinigung der DP1-Proteine mittels *Inverse transition cycling*

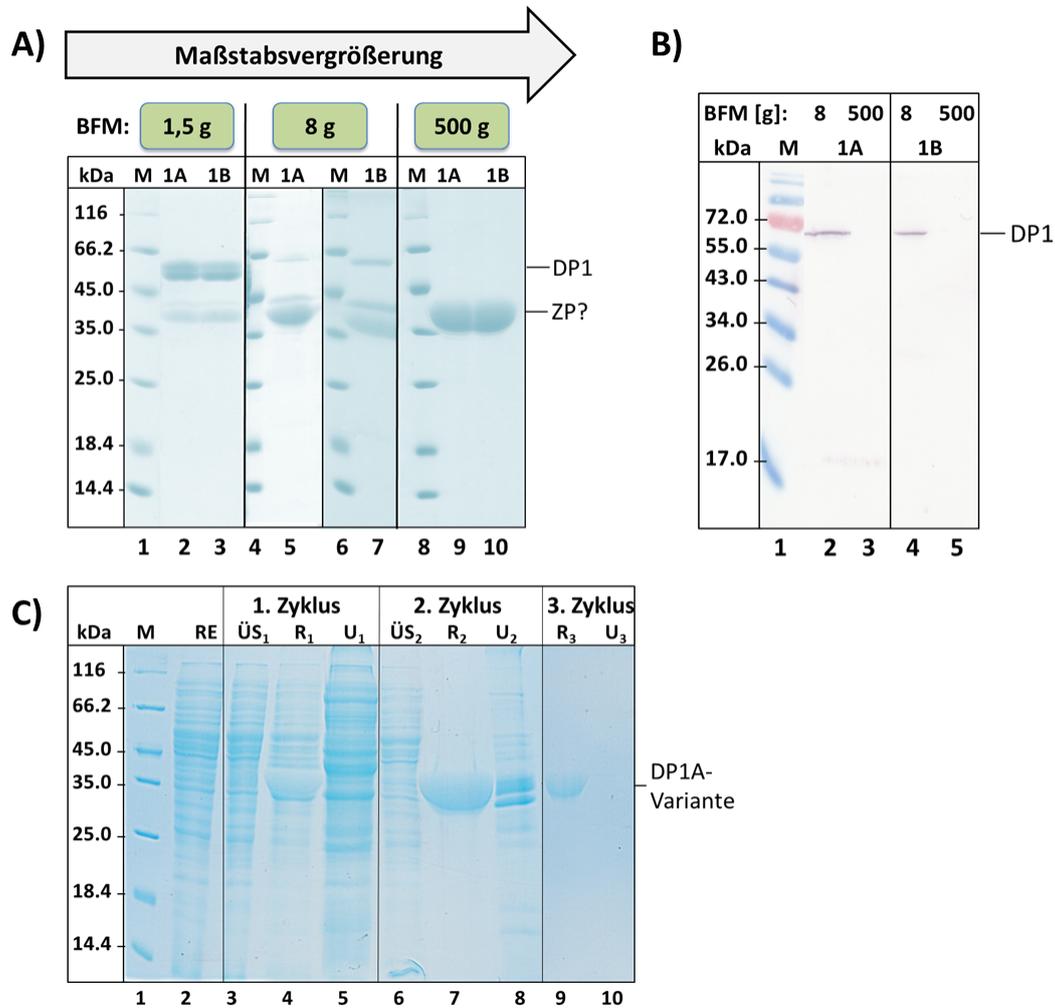
Als alternative Reinigungsstrategie der DP1-Proteine wurde das *Inverse transition cycling* (ITC) getestet. DP1A/B enthalten als kohäsiven Block ein Elastin-ähnliches Polypeptid (ELP). Das ITC-Verfahren wird klassisch zur Reinigung ELP-haltiger Zielproteine genutzt, um diese spezifisch von den anderen Wirtsproteinen abzutrennen (Kap. 1.4.2.1, Abb. 1-13, S. 21). Für die Reinigung wurde das Protokoll basierend auf der Arbeit von Meyer und Chilkoti [Meyer und Chilkoti, 2002] verwendet. Zu Beginn wurden verschiedene Bedingungen in Vorversuchen untersucht, um daraus die beste Kombination für die Reinigung der DP1 mittels ITC zu ermitteln. Als Basispuffer wurde ein Natriumphosphat-basierter Puffer verwendet: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TRIS, 300 mM NaCl (pH 8,0). Der reversible Übergang von ELP bei einer bestimmten Temperatur ( $T_i$ ) kann durch die Auswahl des Salzes und dessen Konzentration im Ansatz

sowie durch die Temperatur der Lösung kontrolliert werden [MacEwan et al., 2014]. Die Experimente zur Auswahl des Salzes zeigten, dass der Übergang in den DP1 auch durch Zugabe von KCl zum Basispuffer während des ITC stattfindet und KCl für die weiteren Analysen verwendet werden konnte (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigte KCl einen positiven Effekt auf die Inhibierung von Proteasen im Rohextrakt. Die Analyse des Reinigungsverlaufs erfolgte mittels SDS-PAGE und die Proteinkonzentration aller Proben im Reinigungsverlauf wurde mittels BCA-Assay (Kap. 2.2.6.1.2, S. 43) bestimmt. Die Ergebnisse der Vorversuche zur Übergangstemperatur ( $T_i$ ), Ionenstärke (KCl-Konzentration), Inkubationsdauer bei  $T_i$  und die Dauer der Zentrifugation bei  $T_i$  sind tabellarisch im Anhang (Tabelle 8-7) zusammengefasst. Daraus ergab sich die beste Kombination für den vollständigen thermischen Übergang der DP1. Der Versuchsablauf ist in Kap. 2.2.5.2 (S. 42) beschrieben.

Das Ergebnis der Reinigung aus 1,5 g BFM ist für beide Zielproteine zusammenfassend in Abb. 3-15 A dargestellt. In der finalen Probe (Spur 2 und 3) war eine Doppelbande auf Höhe der Zielproteine (DP1A: 57,9 kDa; DP1B: 57,4 kDa) zu erkennen. Zusätzlich wurde ein Protein mit einer elektrophoretischen Größe von ~ 38 kDa detektiert, das mittels ITC angereichert wurde. Anhand der Bandenintensität in der SDS-PAGE ließ sich davon ableiten, dass es sich nur um einen geringen Anteil am Gesamtprotein handelt. In der Western-Blot-Analyse der finalen Probe wurde ein positives Signal auf Höhe des Zielproteins detektiert, jedoch nicht bei 38 kDa (Daten nicht gezeigt). Der vollständige Reinigungsverlauf aus 1,5 g BFM ist beispielhaft für DP1B dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Abb. 8-13, S. 179).

Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte eine Maßstabsvergrößerung für die Reinigung beider DP1-Proteine. Insgesamt waren die Aufarbeitungszyklen kongruent zum kleinen Maßstab mit dem signifikanten Unterschied, dass die Zielproteinbande geringer wurde. Mit zunehmender *E. coli* BW3110 Biofeuchtmasse und der damit einhergehenden verlängerten Dauer des ITC-Verfahrens, war in der Zielprotein-enthaltenden Fraktion sowohl in der Aufarbeitung aus 8 g als auch aus 500 g BFM hauptanteilig eine Bande bei 38 kDa zu erkennen (Abb. 3-15A). Vergleichend zu den Ergebnissen zur Reinigung aus 1,5 g BFM zeigte bereits die Maßstabsvergrößerung zur Aufarbeitung aus 8 g BFM, dass das Bandenverhältnis deutlich verschoben ist (DP1A: Spur 5; DP1B: Spur 7). Ähnlich wie bei der chromatografischen Reinigung (Kap. 3.2.3.2.1, S. 70) scheint der Abbau stark vom Maßstab und der Dauer der Aufarbeitung abhängig zu sein. In der SDS-PAGE-Analyse war die Zielproteinbande auf Höhe von ca. 57 kDa kaum sichtbar. In der Reinigung aus 500 g BFM war nach dem ITC-Verfahren nur ein Produkt auf ca. 38 kDa nachzuweisen (Abb. 3-15A, DP1A: Spur 9; DP1B: Spur 10).

Es war demnach davon auszugehen, dass es sich bei dem angereicherten Protein mit einer Größe von ~ 38 kDa um eine verkürzte DP1-Variante handelt, die aufgrund des Verhaltens im ITC eine ELP-Sequenz enthält. Zur Verifizierung dieser Hypothese und um auszuschließen, dass es sich um ein *E. coli*-eigenes Protein handelt, erfolgte eine massenspektrometrische Analyse der finalen Proben. Die MS-Daten bestätigten, dass es sich bei den gereinigten 38 kDa-Fragmenten um verkürzte DP1-Varianten handelt (DP1A: Abb. 3-18 A, S. 82; DP1B: Kap. 8.1.1, Abb. 8-1, S. 168). In der WB-Analyse (Abb. 3-15B) war im Gegensatz zur Aufarbeitung aus 8 g BFM (DP1A: Spur 2; DP1B: Spur 4) für das Produkt des ITC aus 500 g BFM kein Signal für DP1A (Spur 3) und DP1B (Spur 5) nachweisbar.



**Abb. 3-15** Reinigung der DP1-Proteine aus 1,5 g bis zu 500 g *E. coli* Biofeuchtmasse (BFM) mittels *Inverse transition cycling* (ITC)

A – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Reinigungsverlauf von DP1A/B mittels ITC. Übersicht der gereinigten DP1 und deren Fragmente in unterschiedlichen Aufarbeitungsmaßstäben. Durch Maßstabserhöhung (Reinigung aus mehr Biofeuchtmasse) verändert sich das Bandenmuster der gereinigten DP1. B – Western-Blot der finalen Proben R<sub>3</sub> DP1A/B aus den Aufarbeitungen aus 8 g und 500 g BFM im Vergleich. C – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus der Aufarbeitung der DP1A-Variante aus 500 g BFM mittels ITC. Gezeigt ist der gesamte Reinigungsverlauf. M – Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific) oder im WB PPL, *Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, ÜS<sub>n</sub> – Überstand nach n-ten Zyklus (enthält *E. coli*-eigene Proteine), U<sub>n</sub> – Unlösliche Fraktion nach n-ten Zyklus (enthält *E. coli*-eigene Proteine), R<sub>n</sub> – Resolubilisiertes Pellet nach n-ten Zyklus (enthält Zielproteine DP1A/B), ZP – Zielprotein. Auftragung: 20 µg RE und der Proben des 1. Zyklus, 10 µg der Proben des 2. Zyklus, 3 µg der Proben des 3. Zyklus und 5 µL Marker. Die Größe der zu erwartenden Zielproteine (theoretisches Molekulargewicht DP1A: 57,9 kDa; DP1B: 57,4 kDa) sowie der DP1A/B-Varianten (ca. 38 kDa) sind gekennzeichnet.

Nachfolgend wurden verschiedene Strategien getestet, um dem Abbau der DP1-Proteine während der Reinigung mittels ITC entgegenzuwirken. Im Laufe der experimentellen Untersuchungen erfolgte die Übertragung auf ein anderes Puffersystem (3-Komponentenpuffer: 50 mM TRIS, 25 mM MES, 25 mM Na-Acetat), um das ITC bei verschiedenen pH-Werten zu testen. Der Einfluss des pH-Wertes wurde sowohl mit mechanischem als auch enzymatischem Zellaufschluss mittels Lysozymverdau nach einmaligem Gefrier-Tau-Zyklus untersucht. Unabhängig vom pH-Wert wurde mittels mechanischem Aufschluss ein Proteingemisch (Banden auf der Höhe von ca. 38 und 42 kDa) isoliert (Daten nicht gezeigt). Das beste Ergebnis im Hinblick

auf Bandenreinheit konnte aus der Kombination von enzymatischem Zellaufschluss mit einem pH-Wert zwischen 7,0 – 8,0 erzielt werden. Dabei wurde die Proteinbande bei 38 kDa angereichert. Aus diesem Grund blieben die experimentellen Bedingungen für die weiteren Aufarbeitungen bestehen (Kap. 2.2.5.2, S. 42). Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass beide DP1-Proteine unabhängig vom pH-Wert des Puffers und der verwendeten Aufschlussmethode fragmentiert werden. Auch die erneute Untersuchung verschiedener Protease-Inhibitoren (PMSF, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail von Roche, Protease Inhibitor Mix III von Genaxxon) konnte den Abbau von DP1A/B nicht unterbinden.

Der ITC-Gesamtprozess für die Aufarbeitungen aus 500 g *E. coli* BW3110 BFM ist beispielhaft für die DP1A-Variante gezeigt (Abb. 3-15C, S. 76). Der Rohextrakt (RE) wurde auf 40 °C erwärmt, um den reversiblen Temperaturübergang der DP1-Proteine im ITC zu erzeugen. Im 1. ITC-Zyklus konnten Kontaminationen im Überstand (ÜS<sub>1</sub>, Spur 3) von den DP1-Proteinen abgetrennt werden. Nach Resolubilisieren und erneuter Zentrifugation der Pelletfraktion wurden weitere Wirtszellproteine im unlöslichen Anteil separiert (U<sub>1</sub>, Spur 5) während das Zielprotein resolubilisierbar war (R<sub>1</sub>, Spur 4). Neben einigen Verunreinigungen war bereits eine distinkte Bande auf Höhe von ca. 38 kDa für beide Proteinreinigungen zu erkennen. Nach dem 2. ITC-Zyklus verblieben *E. coli*-eigenen Proteine im Überstand (ÜS<sub>2</sub>, Spur 6). Weitere unlösliche Kontaminationen wurden nach erneuter Zentrifugation abgetrennt (U<sub>2</sub>, Spur 8). In der Zielprotein-enthaltenden Fraktion (R<sub>2</sub>, Spur 7) war hauptanteilig die Bande bei 38 kDa zu erkennen. Zusätzlich erfolgte im 3. ITC-Zyklus ein Pufferwechsel in 10 mM NH<sub>4</sub>-Acetat (pH 5,0) in Vorbereitung auf die Lyophilisation (R<sub>3</sub>, Spur 9). Dieser Schritt verlief ohne Verlust an Zielprotein (U<sub>3</sub>, Spur 10). Die Ergebnisse für die DP1B-Variante waren vergleichbar. In den finalen Zielprotein-enthaltenden Fraktionen (R<sub>3</sub>) war die Bande bei 38 kDa sichtbar (Abb. 3-15A, S. 76, DP1A: Spur 9, DP1B: Spur 10).

Zusammenfassend war es nicht möglich die Fragmentierung von DP1A/B während der Reinigung mittels ITC zu verhindern. Für die Entscheidung, ob mit diesem Konstrukt in zukünftigen Experimenten weitergearbeitet werden sollte, war ein Nachweis von Mfp-3-Sequenzanteilen in den verkürzten DP1-Varianten notwendig. Aus der Literatur war bekannt, dass auch kurze Mfp-Peptide gute adhäsive Eigenschaften zeigen können [Li et al., 2017; Numata und Baker, 2014; Yamamoto et al., 2000; Yu und Deming, 1998]. Aus diesem Grund kann eine verkürzte DP1-Variante mit modifizierbaren Mfp-Anteilen (Tyr) ebenfalls gute Klebeeigenschaften zeigen. Dabei bleibt die Grundidee zum Design eines neuartigen proteinogenen Bindemittels aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken (Kap. 1.3, S. 9) erhalten.

Zur weiteren Bearbeitung der DP1-Proteine war demnach eine genaue Kenntnis der Fragmentierungsmuster notwendig. Zudem sollte untersucht werden, ob es sich um ein homogenes Proteinkonstrukt oder ein Proteingemisch mit zufälligen Termini handelt. Dafür wurde eine N-terminale Sequenzierung nach Edman mit Bestimmung der ersten fünf Aminosäuren (AS) für die DP1-Proteine durchgeführt. Für die Analyse des N-Terminus wurden Proben aus jeweils drei unabhängigen Reinigungen der DP1-Varianten von einem externen Anbieter (Proteome Factory AG) analysiert. Die Proteine wurden zuvor in 50 mM NH<sub>4</sub>-Acetat (pH 5,0) überführt. In der Analyse wurde der tatsächliche N-Terminus für beide Zielproteine an Position 163 identifiziert (Tabelle 3-5). Basierend auf diesen Ergebnissen ergeben sich folgende theoretischen Molekulargewichte (MW): DP1A-Variante 39,3 kDa und DP1B-Variante 38,8 kDa. Die detektierten Fragmente haben ein MW, welches dem Laufverhalten in der SDS-PAGE entspricht. Interessanterweise deutet die Schnittstelle auf einen Trypsin-ähnlichen Verdau (zwischen basischen AS) hin. Da es in der Sequenz der Muschelfußproteine (Mefp-3 und Mgfp-3) jedoch

mehrere potenzielle Schnittstellen für ein Trypsin-ähnliches Enzym gibt, scheint diese Schnittstelle für eine unbekannte Protease exponiert zu sein.

**Tabelle 3-5 Resultate der N-terminalen Sequenzierung nach Edman sowie Bestimmung und Vergleich der Proteinparameter der DP1-Varianten mittels ProtParam.**

Zielprotein	MW (kDa)	pI	N-Terminus (Edman-Seq.)
DP1A	57,9	9,84	(R <sub>162</sub> )↓R <sub>163</sub> G <sub>164</sub> K <sub>165</sub> Y <sub>166</sub> W <sub>167</sub>
DP1B	57,4	9,85	(R <sub>162</sub> )↓K <sub>163</sub> Y <sub>164</sub> Y <sub>165</sub> G <sub>166</sub> G <sub>167</sub>

Da die Schnittstelle in der Mfp-3-Sequenz lag, war davon auszugehen, dass dieser Sequenzteil auch eine mögliche Substratsequenz im C-terminalen Bereich der DP1-Proteine sein kann. Aus diesem Grund wurde eine C-terminale Sequenzierung der DP1A-Variante mittels ISD/T3-MS-Analyse in Auftrag gegeben (Kap. 8.1.2.1.1.2.4, S. 170). Nach der Bestimmung des N-Terminus durch die Edman-Sequenzierung (Tabelle 3-5, S. 78) wurde die durchschnittliche Masse ( $M_{\text{average}}$ ) der DP1A-Variante zunächst auf 39338,50 Da berechnet (*Peptide Mass Calculator*). Mittels MADLI-TOF-MS wurden die intakten Massen (engl. *Intact mass*) der DP1A-Variante bestimmt. Die Analyse ergab eine monoisotopische Masse von 34854,8 Da (Abb. 3-18 A, S. 82). Daraus ließ sich im Durchschnitt eine Massendifferenz von - 4481,7 Da bestimmen und unterstützte die Hypothese weiterer Fragmentierung. Bei der Analyse mittels *in-source decay* (ISD) (Kap. 8.1.2.1.1.2.4, S. 170) konnte dann bestätigt werden, dass auch der C-Terminus der DP1A-Variante verkürzt vorliegt. Die Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 11, Abb. 11-6 und Tabelle 11-2). Die detektierte Schnittstelle, -PPR↓RYG-, liegt ebenfalls wie bei der N-terminalen Fragmentierung zwischen zwei basischen Aminosäuren (AS). Die ermittelte Proteinsequenz aus den Ergebnissen der Edman-Sequenzierung (Kap. 3.2.3.2.2, Tabelle 3-5, S. 78) und der ISD/T3-Analyse der DP1A-Variante ist in Abb. 3-16 schematisch dargestellt. Anhand dieser Ergebnisse ergibt sich für die DP1A-Variante eine neue theoretische monoisotopische Masse von 34855,23 Da, welche der Masse aus der MALDI-TOF/TOF-Messung (Abb. 3-18 A und Tabelle 3-7) entspricht. Die gereinigte DP1A-Variante enthält somit nur vier Tyr, die potenzielle Hydroxylierungsstellen der His<sub>6</sub>-mTyr darstellen. Dieses Ergebnis war unerwartet, weil in der Einzelsequenz von Mefp-3 keine Fragmentierung nachweisbar war und das intakte Protein mittels MALDI-MS nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.2.2.3.2, Abb. 3-11, S. 67).

Basierend auf den Ergebnissen der Edman-Sequenzierung und der massenspektrometrischen Analyse erfolgte eine detaillierte Recherche zu einer Trypsin-ähnlichen Protease in *E. coli*, die für die spezifische Fragmentierung innerhalb der DP1-Proteine verantwortlich sein könnte. Dabei wurde die Protease II (ptrB) als potenzieller Kandidat identifiziert. Es handelt sich um eine endogene Serin-Protease, die nach Lys- und Arg-Resten (P1) innerhalb der Polypeptidkette schneiden kann [Kanatani et al., 1991]. Befindet sich ein Pro an Position P1' oder P2', ist die Protease nicht aktiv. Im Allgemeinen ist zu der Protease II wenig bekannt und ihre Funktion ist bisher noch nicht vollständig geklärt [Mattiuzzo et al., 2014]. Die ptrB wird nicht durch PMSF inhibiert, welches in der Aufarbeitung von DP1A/B eingesetzt wurde (Kap. 2.2.5.2, S. 42). Untersuchungen der Protease zeigten, dass die Aktivität z.B. durch 1 mM Tosyl-L-lysinchloromethylketon (TLCK) oder 1 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP) gleichermaßen inhibiert werden kann [Pacaud und Richaud, 1975; Tsuru und Yoshimoto, 1994]. Aus diesem Grund wurde eine Reinigung von DP1A durchgeführt, bei dem im Resuspensionspuffer 1 mM PMSF und beispielhaft 1 mM DFP eingesetzt wurde. Zudem wurde ein Stabilitätstest des Rohextraktes (RE) bei Raumtemperatur mit und ohne 1 mM DFP im Resuspensionspuffer durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2,



DP1A/B-Variante kann aus der Kombination von enzymatischem Zellaufschluss mittels Lysozym nach einem Gefrier-Tau-Schritt und Verwendung eines Puffersystems bei pH 8,0 reproduzierbar erhalten werden. Zusätzlich konnten durch eine N-terminale Sequenzierung nach Edman und durch die C-terminale Sequenzierung mittels MALDI-MS die vorliegenden Termini eindeutig bestimmt werden. Beide DP1-Varianten werden innerhalb der Mfp-3-Sequenz spezifisch zwischen zwei basischen Aminosäuren geschnitten. Die Untersuchungen mit dem ptrB-spezifischen Inhibitor DFP (Kap. 8.2, Abb. 8-14, S. 180) zeigten keine Verbesserung der Fragmentierungsproblematik, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass ptrB nicht proteolytisch auf DP1A wirkt. Auch die Membran-gebundene Protease OmpT konnte durch den Wechsel zu einem *E. coli* Stamm ohne aktive OmpT für die heterologe Produktion von DP1A als Ursache für den Abbau ausgeschlossen werden (Kap. 8.2, Abb. 8-15, und Abb. 8-16, S. 181). Im Rahmen der vorgelegten Arbeit konnte trotz der Untersuchung verschiedener Strategien keine Lösung der Fragmentierungsproblematik gefunden werden.

Dennoch enthalten die DP1-Varianten adhäsive Mfp-3-Sequenzanteile des ursprünglichen Designs (Kap. 3.1.1.2, S. 52), deren Tyrosine mittels der His<sub>6</sub>-mTyr zu DOPA hydroxyliert werden können. Da bereits ausreichend Biomasse und Zielprotein zur Verfügung stand, sollten demnach die verkürzten DP1-Varianten funktionell charakterisiert und deren Bindemiteleigenschaften untersucht werden (Kap. 3.3, S. 90). Die Proteinausbeuten der Aufarbeitungen im großen Maßstab, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind in Tabelle 3-6 zusammengefasst. Durchschnittlich konnten pro Ansatz ~ 300 mg DP1-Variante aus ca. 550 g BFM gewonnen werden. Nach der Lyophilisation wurde der Proteinpuder (weiß-beige, flockig) bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

**Tabelle 3-6 Resultate der Aufarbeitungen der DP1-Varianten mittels *Inverse transition cycling* (ITC) aus ca. 500 – 600 g *E. coli* BW3110. Ausbeuten beziehen sich auf die Proteinmenge pro eingesetztem Gramm Biofeuchtmasse (BFM). Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt.**

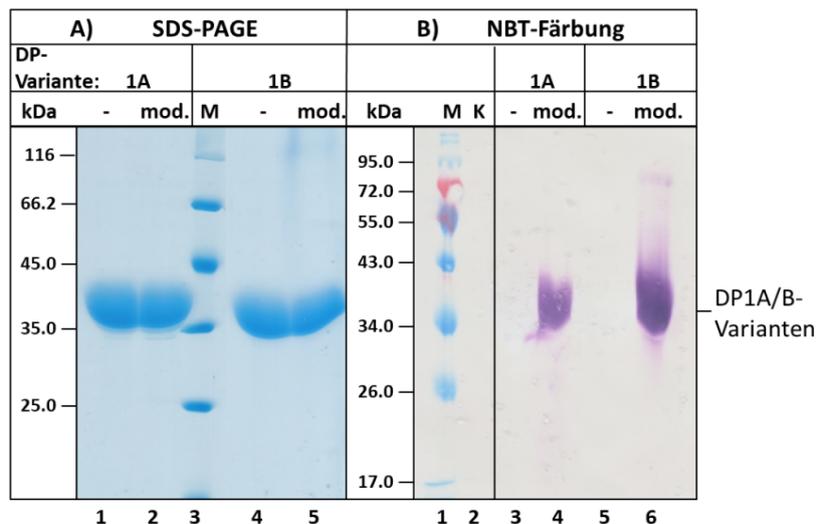
Zielprotein	Experiment	Eingesetzte BFM (g)	Gesamtproteinmenge nach Reinigung (mg)	Protein-ausbeute (mg <sub>Protein</sub> /g <sub>BFM</sub> )
DP1A-Variante	1	599	369	0,62
	2	500	254	0,51
DP1B-Variante	1	497	245	0,50
	2	600	360	0,60

### 3.2.3.3 *In vitro* Modifikation der DP1-Varianten mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase

Zur funktionellen Charakterisierung der modifizierten Designer-Proteine sollten die DP1-Varianten mit der in Kap. 3.2.1.2 (S. 54) rekombinant hergestellten mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) modifiziert werden. In Kap. 3.2.2.3 (S. 64) wurde bereits die Hydroxylierung zu DOPA in die adhäsiven Einzelblöcke (Mfp-3) gezeigt. Der Nachweis der entsprechenden *in vitro* Modifikation der Tyr innerhalb der Designer-Proteine ist für die weitere Charakterisierung und Verwendung essentiell. Die zwei bereits beschriebenen Nachweismethoden NBT-Färbung (Kap. 3.2.2.3.1, S. 64) und MALDI-TOF-MS (Kap. 3.2.2.3.2, S. 65) wurden entsprechend für die DP1-Varianten eingesetzt. Die Ergebnisse beider Analysemethoden sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

#### 3.2.3.3.1 Qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung

Die Reaktionsbedingungen für die Modifikation der DP1-Varianten sind in Kap. 2.2.6.4.2 (S. 46) beschrieben. In dem SDS-PA-Gel ist für beide Proteinvarianten eine distinkte Bande vor (Abb. 3-17 A, DP1A-Variante, Spur 1; DP1B-Variante, Spur 4) und nach der Modifikationsreaktion (DP1A-Variante, Spur 2; DP1B-Variante, Spur 5) bei ca. 38 kDa zu erkennen. In Abb. 3-17 B ist der NBT-Blot gezeigt und es ließ sich sowohl für die DP1A-Variante (Spur 4) als auch für die DP1B-Variante (Spur 6) DOPA nachweisen. Für beide Proteine ist auf der zu erwartenden Höhe eine blau-violett gefärbte Bande zu sehen. In den Proben vor der Modifikationsreaktion (DP1A-Variante, Spur 3; DP1B-Variante, Spur 5), sowie für die Kontrollreaktion mit His<sub>6</sub>-mTyr ohne Substrat (K, Spur 2) ist hingegen kein Signal detektierbar. Durch die Hydroxylierung zu DOPA kann es zwischen den Protein-Molekülen zu verstärkten intermolekularen Interaktionen kommen. Dies könnte eine Erklärung für die leicht verschmierten Banden sein (Abb. 3-17 B).



**Abb. 3-17 Modifikation der DP1-Varianten und qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung**

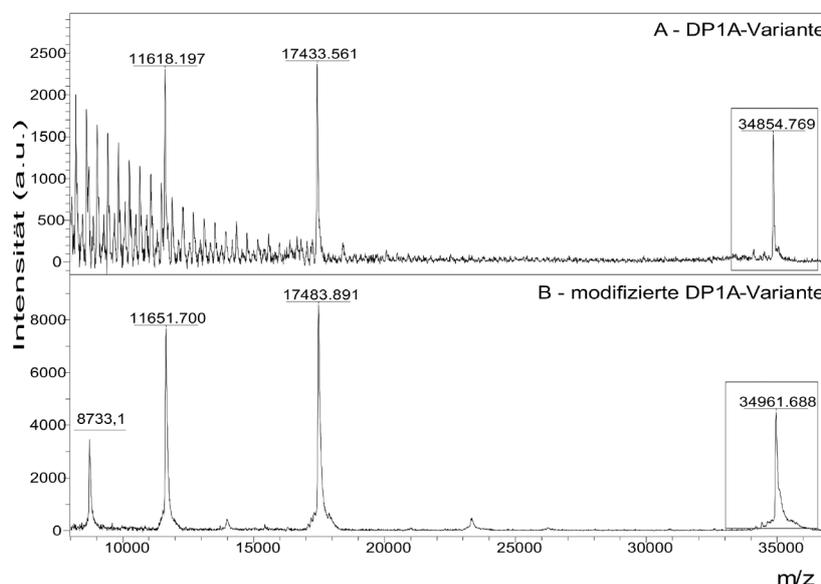
SDS-PAGE Analyse (A) und NBT-gefärbter Western-Blot (B) vor und nach Modifikation der DP1A-Varianten mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) bei 25 °C für 5 h. M – Marker, (-) – vor Reaktion mit der His<sub>6</sub>-mTyr, mod. – modifizierte Proteinvariante nach enzymatischer Reaktion, C – Kontrollreaktion, His<sub>6</sub>-mTyr inkubiert bei 25 °C für 5 h ohne Substrat. Aufgetragen wurden 5 µg Protein und 5 µL Marker. Die DP1A-Varianten sind gekennzeichnet (ca. 38 kDa).

Im Anschluss erfolgte ein weiterer *Inverse transition cycling* (ITC) – Schritt, um His<sub>6</sub>-mTyr vom Zielprotein zu trennen. Während des inversen Temperaturübergangs bei 40 °C verbleibt die His<sub>6</sub>-mTyr im Überstand und die modifizierten DP1-Varianten im Pellet. Die Zielproteine wurden in 10 mM NH<sub>4</sub>-Acetat (pH 5,0) resolubilisiert, lyophilisiert und bis zur weiteren Untersuchung bei - 20 °C gelagert. Der Puder der modifizierten DP1-Proteine war cremeweiß und wies eine Woll-ähnliche Konsistenz auf.

### 3.2.3.3.2 Bestimmung des Modifizierungsgrades mittels Massenspektrometrie

Für die quantitative Analyse der Inkorporation von DOPA innerhalb der DP1A-Variante wurde eine MALDI-TOF/TOF-Analyse durchgeführt (Kap. 2.2.6.4.4, S. 47). Aus den Ergebnissen zur massenspektrometrischen Untersuchung des adhäsiven Einzelblocks Mefp-3 in Kap. 3.2.2.3.2 (S. 65) war bereits bekannt, dass die mikrobielle Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) in der Lage ist zehn Hydroxylierungen in Mefp-3 einzufügen. Nach der Bestimmung des N-Terminus durch die Edman-Sequenzierung und des C-Terminus mittels ISD/T3-MS-Analyse (Abb. 3-16, S. 79) wurde die durchschnittliche Masse ( $M_{\text{average}}$ ) der DP1A-Variante auf 34855,23 Da berechnet. Die

gereinigte DP1A-Variante enthält somit vier Tyr, die potenzielle Hydroxylierungsstellen der His<sub>6</sub>-mTyr darstellen. Mittels MADLI-TOF-MS wurden die intakten Massen (engl. *Intact mass*) der nicht-modifizierten und modifizierten DP1A-Variante bestimmt. Jede Hydroxylierung führt zu einer zusätzlichen Masse von ~ 16 Da.



**Abb. 3-18 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse der DP1A-Variante vor und nach der Reaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) zur Bestimmung der Anzahl eingefügter OH-Reste**

MALDI-TOF-Massenspektren der DP1A-Varianten zur Bestimmung der intakten Proteinmassen (*intact mass analysis*): A – nicht-modifiziert, B – modifizierte DP1A-Variante. Insgesamt konnten 3 – 4 verschiedene Ladungszustände nachgewiesen werden. Die zugehörigen detektierten monoisotopischen Massen sind in Tabelle 3-7 (S. 83) aufgelistet. Die DP1A-Variante besitzt eine theoretische monoisotopischen Masse von 34855,23 Da (bestimmt mit dem *Peptide Mass Calculator*). Die Analysen wurden von Dr. Naumann (Fraunhofer IZI) durchgeführt („*Dried-droplet*“-Präparation mit 70 % DHAP-Matrix, Reflektormodus).

Bei den Analysen der nicht-modifizierten DP1A-Variante wurde eine Masse des einfach geladenen Molekül-Ions von 34854,8 Da detektiert (Abb. 3-18 A). Das intensivste Signal im Massenspektrum bei m/z 17433,6 konnte dem zweifach geladenen (intakten) Molekül-Ion zugeordnet werden. Insgesamt drei verschiedene Ladungszustände mit einer durchschnittlichen Masse von 34856,8 Da (SD = 5,93) konnten in dem für die DP1A-Variante aufgenommenen Massenspektrum gemessen werden (Tabelle 3-7, S. 83).

Bei der massenspektrometrischen Analyse von zwei DOPA-modifizierten Proben von DP1A wurden im Mittel Massen von 34981,7 Da und 34951,7 Da nachgewiesen (Tabelle 3-7), was 5 – 7 zusätzlichen OH-Resten entspricht. In Abb. 3-18 B ist beispielhaft das Massenspektrum der mod. DP1A-Variante einer Messung gezeigt. In dem aufgenommenen Massenspektrum wurden insgesamt vier verschiedene Ladungszustände beobachtet, wobei das Signal für das zweifach positiv geladene Molekül-Ion bei m/z 17483,9 die höchste Intensität aufwies (Tabelle 3-7, S. 83). Aus der Massendifferenz zur nicht-mod. DP1A-Variante mit  $m = 75,1$  Da ergab sich eine Anzahl von ~ 5 Hydroxylierungen. Da nur vier Tyr in der Sequenz der DP1A-Variante vorkommen, ist eine weitere Hydroxylierung von DOPA zu TOPA (3,4,5-Trihydroxyphenylalanin) denkbar. Diese Hypothese wurde bereits bei den massenspektrometrischen Analysen von Mefp-3 aufgestellt. Die Untersuchungen von unlöslichen Mefp-3 (Pellet) zeigten neben den potenziell 10 Hydroxylierungen zwei weitere um 16 Da größere Massen, was das Vorhandensein von TOPA vermuten ließ (Kap. 3.2.2.3.2, Abb. 3-11 C, S. 67). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Tyr-enhaltene Muschelpeptide von DOPA zu TOPA mit Hilfe der Pilz-

Tyrosinase hydroxyliert werden können [Burzio und Waite, 2002; Numata und Baker, 2014]. Für mikrobielle Tyrosinase aus *V. spinosum* wurde TOPA bislang noch nicht nachgewiesen. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF MS-Messungen der nicht-mod. und mod. DP1A-Variante in Tabelle 3-7 aufgelistet.

**Tabelle 3-7 Übersicht der detektierten Massen der DP1A-Varianten aller Ladungszustände mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse (Die theoretische  $M_{\text{average}}$  der DP1A-Variante beträgt 34876,64 Da (bestimmt mit dem *Peptide Mass Calculator*). Alle Angaben sind in Dalton (Da).**

Protein	DP1A-Variante		mod. DP1A-Variante (1)		mod. DP1A-Variante (2)	
	m/Z <sub>observed</sub>	$M_{\text{Avg., exp.}}$	m/Z <sub>observed</sub>	$M_{\text{Avg. exp.}}$	m/Z <sub>observed</sub>	$M_{\text{Avg., exp.}}$
Ladungszustand						
(M+H) <sup>+</sup>	34854,8	34853,8	34980,9	34979,9	34961,7	34960,7
(M+2H) <sup>2+</sup>	17433,6	34865,1	17498,7	34995,3	17483,9	34965,8
(M+3H) <sup>3+</sup>	11618,2	34851,6	11659,8	34976,4	11651,7	34952,1
(M+3H) <sup>4+</sup>			8744,8	34975,1	8733,1	34928,3
Durchschnittliche Masse		34856,8		34981,7		34951,7
Standardabweichung		5,93		8,08		14,38
Entspricht folg. Anzahl an OH-Gruppen		-		7,8		5,9

Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung der Hydroxylierungen wurde eine ISD-/T3-Sequenzierung zur Identifizierung der Hydroxylierungsstellen in der modifizierten DP1A-Variante durchgeführt. Die Masse des intakten Molekül-Ions betrug 34960,9 Da. Auch in diesem Experiment zeigte sich eine Massenzunahme von 83,3 Da. Wie in den zuvor gezeigten Analysen zur Modifikation der DP1A-Variante (Tabelle 3-7, S. 83) konnte eine Anzahl von fünf Hydroxylierungen bestätigt werden. Da nur vier Tyr in der Sequenz vorkommen, ist diese Massendifferenz vermutlich auf die Modifikation zu 3x DOPA und 1x TOPA zurückzuführen. Die Ergebnisse der ISD-/T3-Sequenzierung stützen diese Hypothese. Die Messungen zeigten, dass alle Tyr ( $Y_4$ ,  $Y_{416}$ ,  $Y_{417}$ ,  $Y_{421}$ ) hydroxyliert wurden. Das N-terminale Tyr an Position  $Y_4$  weist vermutlich eine zweite Hydroxylierung (zu TOPA) auf, da andernfalls das ISD-Spektrum nicht annotiert werden konnte. Die Ergebnisse sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 11, Abb. 11-7 und Tabelle 11-3). Durch die Modifikation mit His<sub>6</sub>-mTyr wurden, wie bereits für Mefp-3 gezeigt, Proteinspezies mit einer unterschiedlichen Anzahl an OH-Resten in der DP1A-Variante produziert. Die Komplexität der generierten Fragmentspektren resultiert in das Vorhandensein von Mischungen isobarer Proteoformen. Aus diesem Grund konnte im Rahmen dieser Arbeit die exakte Position der TOPA-Modifikation in der DP1A-Variante nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

Zusammenfassend konnte eine DP1-Variante einer Größe von ca. 35 kDa mittels ITC reproduzierbar aus *E. coli* BW3110 gewonnen werden. Die Proteintermini der DP1A-Variante konnten mittels Edman-Sequenzierung (N-Terminus) und ISD/T3-Sequenzierung (C-Terminus) eindeutig bestimmt werden (Abb. 3-16, S. 79). Die Schnittstellen liegen zwischen zwei basischen Aminosäuren (R/R oder R/K). Eine Lösung dieser Fragmentierungsproblematik als auch deren Ursache konnten trotz verschiedener Versuchsansätze (experimentell und *in silico*) im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Die verkürzten DP1-Varianten enthalten jedoch modifizierbare Mfp-3-Sequenzanteile und das N-terminale Tyr ( $Y_4$ ) als auch die drei C-terminalen Tyr ( $Y_{416}$ ,  $Y_{417}$ ,  $Y_{421}$ ) konnten erfolgreich mittels His<sub>6</sub>-mTyr zu DOPA

hydroxyliert werden (Abb. 3-18, S. 82). Zusätzlich bestätigte die MALDI-MS-Analyse 5 – 6 Hydroxylierungen in der mod. DP1A-Variante. Die ISD/T3-Analyse zeigte, dass alle vier Tyr hydroxyliert vorlagen und es darüber hinaus zur Ausbildung von TOPA kam (Kap. 11, Abb. 11-7 und Tabelle 11-3).

Da aus der Literatur bekannt war, dass auch kurze Muschelfußsequenzen adhäsive Eigenschaften zeigen können [Li et al., 2017; Numata und Baker, 2014; Yamamoto et al., 2000; Yu und Deming, 1998], und in den Experimenten nachgewiesen wurde, dass die Proteinvarianten adhäsive und kohäsive Sequenzanteile enthalten, blieb die Grundidee zum Design eines Protein-basierten Bindemittels (Kap. 1.3.1, S. 9) erhalten. Die verkürzten DP1-Varianten wurden folglich für die funktionelle Charakterisierung und die materialwissenschaftlichen Untersuchungen (Kap. 3.3, S. 90) eingesetzt.

### 3.2.4 Designer-Protein 2

Mit Designer-Protein 2 (DP2) sollte ein weiteres Protein mit einer Kombination Elastin-ähnlicher Sequenzen (ELP) als kohäsiven Block und dem Muschelfußprotein-3 aus *Mytilus edulis* (Mefp-3) als adhäsiven Block produziert werden. Dafür wurde die Isoform 2 des humanen Tropoelastin (TE) ausgewählt. Diese konnte bereits erfolgreich in größeren Mengen rekombinant in *E. coli* hergestellt werden und ein Protokoll zur schnellen und einfachen Aufreinigung über eine Acetonextraktion wurde etabliert [Mende, 2022]. TE hat die Eigenschaft der temperaturabhängigen und reversiblen Koazervation und ist demnach dem kohäsiven ELP-Block der DP1-Proteine funktional sehr ähnlich. Zudem enthält der TE-Teil 15 Tyr. Diese könnten neben den zehn Tyr im Mefp-3-Teil auch als Substrat der His<sub>6</sub>-mTyr dienen und somit den DOPA-Anteil erhöhen. Davon ausgehend wäre ein stärkeres Adhäsions- und Kohäsionsverhalten denkbar.

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse von DP2 zur heterologen Produktion in *E. coli* (Kap. 3.2.4.1, S. 84), zur Reinigung mittels *Inverse transition cycling* (ITC) (Kap. 3.2.4.2, S. 85) sowie zur *in vitro* Modifikation mit der mikrobiellen Tyrosinase (Kap. 3.2.4.3, S. 87) gezeigt.

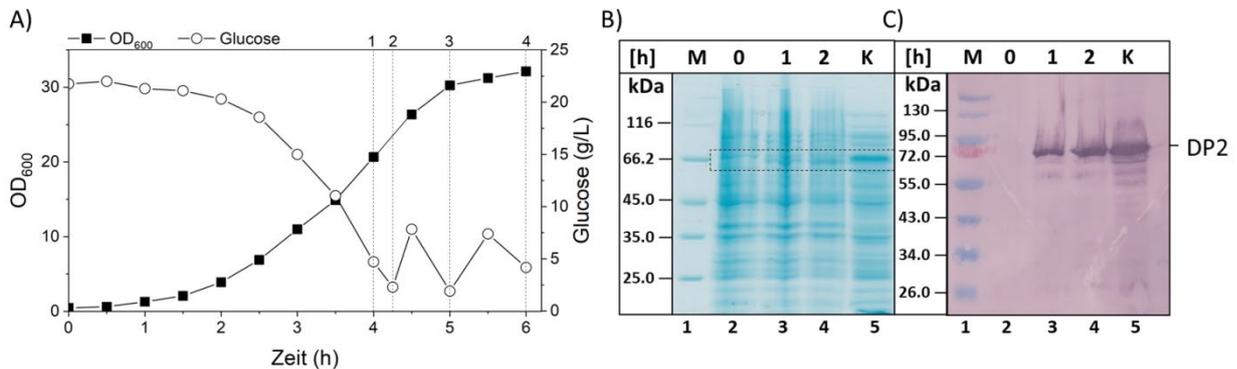
#### 3.2.4.1 Heterologe Produktion in *E. coli*

##### 3.2.4.1.1 Heterologe Produktion im Schüttelkolbenmaßstab

Zu Beginn erfolgten Untersuchungen zur Expression von DP2 in *E. coli*. Es wurden folgende Produktionsparameter variiert: Stamm (*E. coli* KRX und *E. coli* BL21 (DE3) pLysS), Induktionsdauer (2 – 20 h) und Induktionstemperatur (25 °C und 37 °C). Zusammenfassend wurde das beste Ergebnis zur Produktion von DP2 mit folgenden Parametern erzielt: Induktion mit 1 mM IPTG, T = 37 °C, t = 2 h in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Unter dieser Bedingung erreichte die Kultur eine maximale OD<sub>600</sub> von ~ 3,8. Darüber hinaus zeigten diese Vorversuche, dass eine Produktion über Nacht unter den getesteten Bedingungen zum Abbau von DP2 führt und bei der Produktion im Bioreaktormaßstab (Kap. 3.2.4.1.2, S. 84) berücksichtigt werden muss. Nach 2 h Induktion war die Expression von DP2 am stärksten und mit längerer Induktionsdauer nahm die Intensität der Zielproteinbande ab, was auf einen Abbau des Zielproteins schließen lässt. Zum Zeitpunkt der Zellernte (20 h) war im SDS-PA-Gel kaum eine Expressionsbande für DP2 detektierbar (Kap. 8.2, Abb. 8-17, S. 181). Aus diesem Grund ist von einem proteolytischen Abbau des Zielproteins über die Zeit, unabhängig von der getesteten Kultivierungstemperatur, auszugehen.

##### 3.2.4.1.2 Heterologe Produktion im Bioreaktormaßstab

Die Produktion von DP2 erfolgte im 15 L Maßstab in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS basierend auf den Ergebnissen im Schüttelkolbenmaßstab (SK) (Kap. 3.2.4.1.1, S. 84), um ausreichende Mengen für die weiteren Untersuchungen bereitzustellen. Nachfolgend sind die Ergebnisse der Fermentation in Abb. 3-19 dargestellt. Die Fermentationsbedingungen sind in Kap. 2.2.3.1.2 (S. 37) beschrieben. In Abb. 3-19 A sind die Verläufe der *Offline*-Daten der optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) und der Glucosekonzentration gezeigt. Die Induktion mit 1 mM IPTG wurde bei einer  $OD_{600}$  von 20,6 gestartet (Zeitpunkt 1). Anschließend erfolgte nach 15 min (Zeitpunkt 2) und 60 min Induktion (Zeitpunkt 3) jeweils ein Glucose-Puls aus einer 10 g/L *feed*-Lösung für 10 min. Nach einer Induktionszeit von 2 h erreichte die  $OD_{600}$  einen Wert von 32,1 und die Fermentation wurde beendet (Zeitpunkt 4).



**Abb. 3-19 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP2 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mit dem Expressionsvektor pET28a\_DP2 (KanR) im Bioreaktormaßstab**

A – Wachstumskurve und Glucoseverbrauch während der Fermentation von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS unter der getesteten Expressionsbedingung. Zeitpunkte: 1 –  $1/OD_{600}$  Probennahme vor Induktion und Induktion mit 1 mM IPTG, 2 – 1. Glucose-Puls (10 g/L für 10 min), 3 – 2. Glucose-Puls (10 g/L für 10 min),  $1/OD_{600}$  Probennahme nach 1 h Induktion, 4 –  $1/OD$  Probennahme 2 h Induktion und Zellernte. B – SDS-PA-Gel der  $1/OD_{600}$ -Proben vor und nach Induktion (0 h, 1 h, 2 h). C – Western-Blot Analyse der  $1/OD_{600}$ -Proben vor und nach Induktion (0 h, 1 h, 2 h). Als Kontrolle (K) wurde die  $1/OD$ -Probe nach 2 h Induktion der Schüttelkolbenkultivierung mitgeführt. Aufgetragen wurden 10  $\mu$ L Probe und 5  $\mu$ L Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder* oder PPL, *prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific). Das Zielprotein DP2 ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 67,3 kDa).

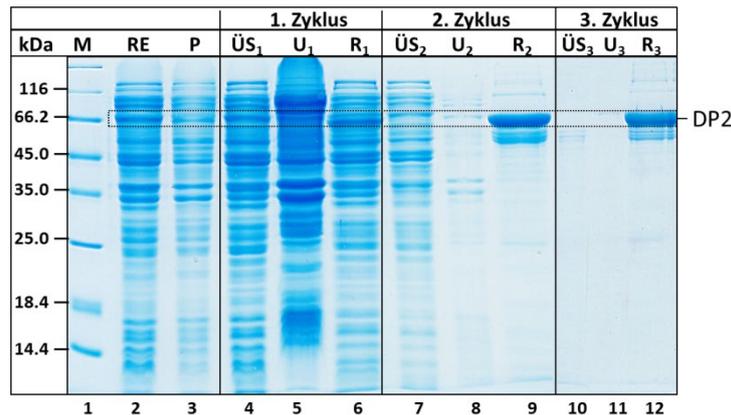
Neben der Untersuchung des Wachstumverhaltens wurde der Erfolg der Fermentationen zur Produktion von DP2 mittels SDS-PAGE (Kap. 2.2.4.1, S. 39) und Western-Blot (Kap. 2.2.4.2, S. 40) analysiert. Anhand der  $1/OD_{600}$ -Proben ist zu erkennen, dass die Intensität der Zielproteinbande während der Induktionsphase (Abb. 3-19 B, Spur 3 – 4) für DP2 (ca. 67,3 kDa) zunimmt. Die Intensität der DP2-Bande war etwas geringer als in den Versuchen im SK (Spur 5). Der WB bestätigte dieses Ergebnis (Abb. 3-19 C).

Zusammenfassend wurde DP2 erfolgreich in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS im 15 L Maßstab produziert. Nach Abtrennung des Fermentationsüberstandes wurden ca. 1,2 kg Biofeuchtmasse gewonnen, welche als Ausgangsmaterial für die nachfolgenden Untersuchungen zur Reinigung von DP2 diente (Kap. 3.2.4.2, S. 85).

### 3.2.4.2 Reinigung von DP2 mittels ITC

Das ITC-Verfahren konnte bereits für die Reinigung der DP1-Varianten etabliert werden (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74). Der kohäsive Block Tropoelastin (TE) in DP2 zeigt ebenfalls die Eigenschaft einer temperaturabhängigen reversiblen Koazervation, welche für die Reinigung mittels ITC verwendet werden kann. In der Literatur wurde dieses Verhalten von TE bereits 1998 beschrieben [Vrhovski und Weiss, 1998]. In Vorversuchen wurden zwei Puffersysteme

verglichen. Zu Beginn wurde der bereits etablierte Puffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TRIS, 300 mM NaCl, 500 mM KCl; pH 8,0), der für das ITC der DP1-Varianten verwendet wurde (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74), eingesetzt. Jedoch lag der Hauptanteil von DP2 unter Verwendung dieses Puffersystems nach Zellaufschluss in der unlöslichen Fraktion vor (Daten nicht gezeigt). Der zweite getestete Puffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl; pH 8,0) basierte auf den Ergebnissen von [Vrhovski und Weiss, 1998]. Mit diesem Puffersystem konnten deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden. DP2 reichert sich nach Zellaufschluss in der Rohextraktfraktion an. Aus diesem Grund wurde dieser Puffer für die Reinigung von DP2 im größeren Maßstab verwendet, welche im Folgenden detailliert vorgestellt wird. Die Proteinkonzentration aller Proben im Reinigungsverlauf wurde mittels BCA-Assay (Kap. 2.2.6.1.2, S. 43) bestimmt.



**Abb. 3-20** Reinigung von DP2 aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mittels *Inverse transition cycling* (ITC)

12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf des ITC von DP2. M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, ÜS<sub>n</sub> – Überstand nach n-ten Zyklus (enthält *E. coli*-eigene Proteine), U<sub>n</sub> – Unlösliche Fraktion nach n-ten Zyklus (enthält *E. coli*-eigene Proteine), R<sub>n</sub> – Resolubilisiertes Pellet nach n-ten Zyklus (enthält Zielprotein DP2). Es wurden 20 µg vom RE und der Proben des 1. Zyklus, 10 µg der Proben des 2. Zyklus, 3 µg der Proben des 3. Zyklus und 5 µL Marker aufgetragen. Die Größe des zu erwartenden Zielproteins DP2 ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 67,3 kDa).

Für die Aufarbeitung wurden 100 g *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Biofeuchtmasse (BFM) in 300 mL Resuspensionspuffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl, 1 mM PMSF; pH 8,0) aufgenommen und mechanisch aufgeschlossen (Kap. 2.2.3.2.1, S. 38). Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt und der Rohextrakt (RE) wurde auf 40 °C erwärmt und zur Reinigung mittels ITC eingesetzt. Die Ergebnisse sind im SDS-PA-Gel in Abb. 3-20 dargestellt. Der Hauptanteil des Zielproteins befand sich nach Zellaufschluss in der löslichen Fraktion (RE, Spur 2). Im 1. ITC-Zyklus konnten Kontaminationen im Überstand (ÜS<sub>1</sub>, Spur 4) und in der unlöslichen Fraktion (U<sub>1</sub>, Spur 5) von DP2 abgetrennt werden. In der Zielprotein-enthaltenden Fraktion (R<sub>1</sub>, Spur 6) ist neben anderen *E. coli*-Proteinen, die ebenfalls bei 40 °C präzipitiert waren, eine distinkte Bande auf Höhe des Zielproteins (67,3 kDa) zu erkennen. Nach dem 2. ITC-Zyklus verblieben diese *E. coli*-eigenen Proteine im Überstand (ÜS<sub>2</sub>, Spur 7). DP2 konnte aus dem Pellet resolubilisiert werden (R<sub>2</sub>, Spur 9) während Verunreinigungen im Pellet (U<sub>2</sub>, Spur 8) verblieben und durch Zentrifugation abgetrennt wurden. Im 3. ITC-Zyklus erfolgte der Pufferwechsel in 10 mM NH<sub>4</sub>-Acetat (pH 5,0) in Vorbereitung auf die Lyophilisation. In diesem Schritt ist kein Zielprotein verloren gegangen (U<sub>3</sub>, Spur 11). DP2 (R<sub>3</sub>, Spur 12) wurde erfolgreich mittels ITC aufgereinigt. Insgesamt konnten in diesem Versuch 45 mg DP2 gewonnen werden. In der finalen Probe sind neben der Zielproteinbande bei ca. 67 kDa auch

Abbaufragmente zu erkennen. Zur Vermeidung des Abbaus wurden auch hier verschiedene Experimente (Testung von Protease-Inhibitoren, Variation in den ITC Prozessschritten) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Jedoch konnte der Abbau von DP2 nicht unterbunden werden. Der Anteil an Fragmenten ist allerdings sehr gering und anhand der Bandenintensität ist DP2, als Vollängen-Protein, das Hauptprodukt des ITC-Verfahrens. Im Gegensatz dazu konnte für die DP1-Proteine mittels ITC nur ein stark fragmentiertes Produkt (Proteinbande bei ca. 38 kDa) gewonnen werden (Abb. 3-15, S. 76). Da dies für DP2 nicht der Fall war, wurde dieses Produkt für die nachfolgenden Untersuchungen der Bindemittleigenschaften (Kap. 3.3.2, S. 96) eingesetzt.

Basierend auf diesem etablierten Protokoll wurden drei Aufarbeitungen durchgeführt und die Ergebnisse sind in Tabelle 3-8 gegenübergestellt. Insgesamt wurde im Durchschnitt eine Proteinausbeute von ca. 0,59 mg<sub>Protein</sub>/g<sub>BFM</sub> ermittelt und ist mit den Ergebnissen zur Aufarbeitung der DP1-Varianten mittels ITC vergleichbar (Tabelle 3-6, S. 80). Nach der Lyophilisation wurde der Proteinpuder bis zur weiteren Bearbeitung bei - 20 °C gelagert.

**Tabelle 3-8** Resultate der Aufarbeitungen von DP2 mittels *Inverse transition cycling* (ITC) aus ca. 100 g *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Ausbeuten bezogen auf die Proteinmenge pro eingesetztem Gramm Biofeuchtmasse (BFM). Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt.

Zielprotein	Experiment	Eingesetzte BFM (g)	Gesamtproteinmenge nach Reinigung (mg)	Protein-ausbeute (mg <sub>Protein</sub> /g <sub>BFM</sub> )
DP2	1	100	45	0,45
	2	105	66,8	0,64
	3	99,6	67,1	0,67

### 3.2.4.3 *In vitro* Modifikation von DP2 mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase

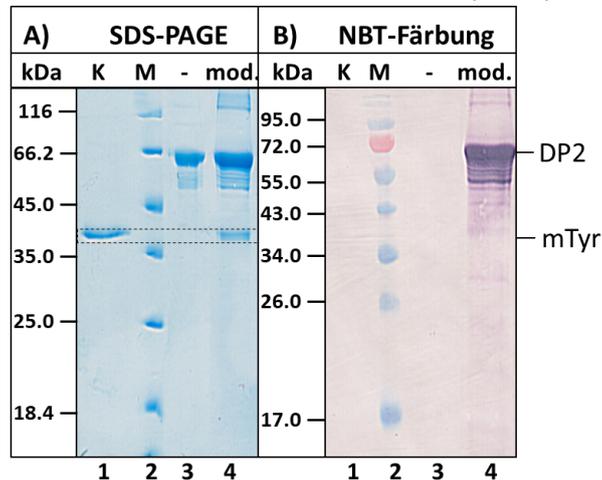
Zur funktionellen Charakterisierung sollte DP2 mit der rekombinant hergestellten mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) (Kap. 3.2.1.2, S. 54) hydroxyliert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Modifikation von Tyr zu DOPA in den adhäsiven Einzelblöcken (Mfp-3) in Kap. 3.2.2.3 (S. 64) sowie in den DP1-Varianten in Kap. 3.2.3.3 (S. 80) gezeigt.

Wie bereits in Kap. 2.2.6.3 (S. 45) beschrieben, wurden in dieser Arbeit zwei Methoden verwendet: der qualitative Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung (Kap. 3.2.2.3.1, S. 64) und die Bestimmung der Anzahl an Hydroxylierungen in den Proteinen mittels MALDI-TOF/TOF-MS (Kap. 3.2.2.3.2, S. 65). Die Ergebnisse der Modifikation und beider Analysemethoden für DP2 sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

#### 3.2.4.3.1 Qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung

Die Reaktionsbedingungen für die Modifikation von DP2 sind in Kap. 2.2.6.4.2 (S. 46) beschrieben. In Abb. 3-21 A ist das SDS-PA-Gel der Modifikationsreaktion gezeigt. Die Kontrollreaktion (K) mit His<sub>6</sub>-mTyr ohne Substrat in Spur 1 zeigt, wie erwartet, ausschließlich eine Bande für die His<sub>6</sub>-mTyr bei 37 kDa. Vor und nach der Modifikationsreaktion (Spur 3 und Spur 4) ist eine distinkte Bande für DP2 zu erkennen. In der Probe nach der Reaktion (Spur 4) ist zusätzlich eine Bande für die His<sub>6</sub>-mTyr auf der zu erwartenden Höhe (37,5 kDa) sichtbar, sowie Banden höheren Molekulargewichts. Durch die Hydroxylierung der Peptid-gebundenen Tyr innerhalb von DP2 kommt es vermutlich zur Ausbildung starker intermolekularer Interaktionen zwischen DP2-Polypeptidketten, die sich durch SDS und Hitzedenaturierung nicht auflösen lassen. In Abb. 3-21 B ist der NBT-Blot dargestellt. In der Probe nach Modifikationsreaktion (Spur 4) ist auf der zu erwartenden Höhe eine blau-violett gefärbte Bande zu sehen, was

die erfolgreiche Modifikation von Tyr zu DOPA in DP2 bestätigte. Hingegen ist kein Signal in der Probe vor der Modifikationsreaktion (Spur 3) detektierbar. Wie bereits in vorherigen Kapiteln gezeigt (Abb. 3-9, S. 65 und Abb. 3-17, S. 81), ist auch in diesem Experiment für die Kontrollreaktion mit der His<sub>6</sub>-mTyr ohne Substrat (Spur 1) der NBT-Blot negativ. Wie in der SDS-PAGE-Analyse konnten ebenfalls im NBT-Blot höhermolekulare Banden in der Probe mit modifiziertem DP2 (Spur 4) nachgewiesen werden. Dies lässt ebenfalls auf verstärkte intermolekulare Interaktionen zwischen DP2-Molekülen durch die Hydroxylierung zu DOPA schließen.



**Abb. 3-21 Modifikation von DP2 und qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung**

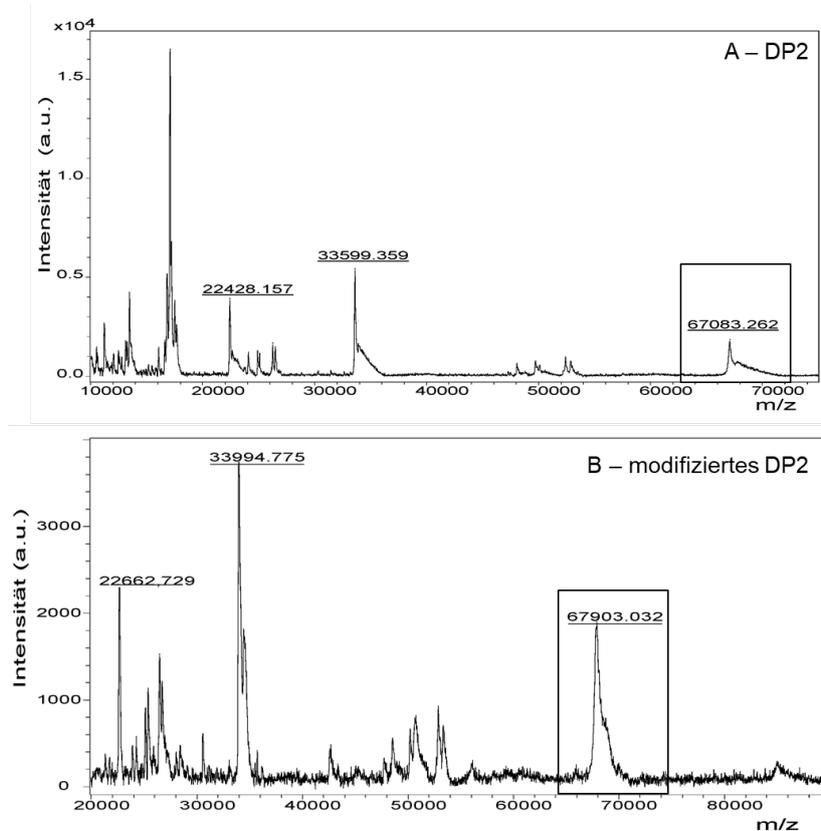
SDS-PAGE Analyse (A) und NBT-gefärbter Western-Blot (B) vor und nach Modifikation von DP2 mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) bei 25 °C für 5 h. M – Marker, (-) – vor Reaktion mit His<sub>6</sub>-mTyr, mod. – modifizierte Proteinvariante nach enzymatischer Reaktion, K – Kontrollreaktion, His<sub>6</sub>-mTyr inkubiert bei 25 °C für 5 h ohne Substrat. Aufgetragen wurden 5 µg Protein und 5 µL Marker. DP2 (theoretisches Molekulargewicht: 67,3 kDa) und His<sub>6</sub>-mTyr (theoretisches Molekulargewicht: 37,5 kDa) sind gekennzeichnet.

Im Anschluss erfolgte ein weiterer *Inverse transition cycling* (ITC) – Schritt, um das Enzym vom Zielprotein zu trennen. Während des inversen Temperaturübergangs bei 40 °C verblieb His<sub>6</sub>-mTyr im Überstand und modifiziertes DP2 im Pellet. Das Zielprotein wurde in 10 mM NH<sub>4</sub>-Acetat (pH 5,0) resolubilisiert, lyophilisiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -20 °C gelagert.

#### 3.2.4.3.2 Bestimmung des Modifizierungsgrades mittels Massenspektrometrie

Für die quantitative Bestimmung der Hydroxylierungen in DP2 wurde eine MALDI-TOF/TOF-Analyse durchgeführt (Kap. 2.2.6.4.4, S. 47). Aus den Ergebnissen zur massenspektrometrischen Untersuchung des adhäsiven Einzelblocks Mefp-3 in Kap. 3.2.2.3.2 (S. 65) war bereits bekannt, dass die mikrobielle Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) in der Lage ist, hochhydroxylierte Proteinspezies zu generieren. Mittels MALDI-TOF/TOF-MS wurden die intakten Massen (engl. *Intact mass*) von nicht-modifiziertem und modifiziertem DP2 bestimmt. Jede Hydroxylierung in DP2 führt zu einer zusätzlichen Masse von ~16 Da. Die Proben wurden zuvor mittels HPLC (Kap. 8.1.2.1.1.1, S. 168) aufgereinigt. Zunächst erfolgte die Messung der nicht-modifizierten Proteinvariante. Die durchschnittliche theoretische Masse ( $M_{\text{average}}$ ) von DP2 beträgt 67330,84 Da. In dem aufgenommenen Massenspektrum wurden insgesamt drei verschiedene Ladungszustände detektiert (Abb. 3-22 A, S. 89), wobei das Signal für das zweifach positiv geladene Molekül-Ion bei  $m/z$  33599,4 die höchste Intensität aufwies. Insgesamt wurde eine durchschnittliche Masse von 67139,5 Da mit einer Standardabweichung (SD) von 81,6 nachgewiesen. Erfahrungswerte zeigen, dass die doppelte SD des Messfehlers ein guter

Kompromiss zwischen Signifikanzverlust und Toleranz gegenüber Ausreißern darstellt [Chamrad et al., 2003]. Somit sind Differenzen  $\pm 100$  Da bei der Massenberechnung von Proteinen aus MALDI-TOF/TOF-Analysen nicht ungewöhnlich und können zur Identifikation von Proteinen verwendet werden.



**Abb. 3-22 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse DP2 vor und nach der Reaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) zur Bestimmung des DOPA-Gehalts**

MALDI-TOF-Massenspektren von DP2 zur Bestimmung der intakten Proteinmassen (*intact mass analysis*): A – nicht-modifiziert, B – modifiziertes DP2. Insgesamt konnten 3 verschiedene Ladungszustände nachgewiesen werden („Dried-droplet“-Präparation mit 70 % DHAP-Matrix, Reflektormodus). Die zugehörigen detektierten monoisotopischen Massen sind in Tabelle 3-9, S. 90) aufgelistet. DP2 besitzt eine theoretische monoisotopischen Masse von 67289,43 Da).

Anschließend erfolgte die massenspektrometrische Analyse von zwei modifizierten Proben von DP2. Im Mittel wurden Massen von 67958,3 Da und 67973,0 Da detektiert. Dies entspricht im Durchschnitt einer Anzahl von ca. 51 OH-Resten. Allerdings ist bei den MALDI-Daten von mod. DP2 zu beachten, dass im Allgemeinen die Intensität der erhaltenen Signale sehr gering war und ein relativ hohes Hintergrundrauschen zu verzeichnen war. In DP2 sind insgesamt 25 Tyr enthalten (TE-Block: 15, Mefp-3-Block: 10). Beispielhaft ist in Abb. 3-22 B das Massenspektrum von mod. DP2 einer Messung dargestellt. Insgesamt konnten ebenfalls drei Ladungszustände detektiert werden, wobei das Signal für das zweifach positiv geladene Molekülion bei m/z 33994,8 die höchste Intensität aufwies (Tabelle 3-9, S. 90). Basierend auf der Masse für nicht-mod. DP2 ergab sich eine Massendifferenz von ca. 818,8 Da, was  $\sim 51$  zusätzlichen OH-Resten entspricht. In der DP2 Sequenz sind jedoch nur 25 Tyr enthalten. Aus diesem Grund kann es, wie bereits für mod. Mefp-3 gezeigt (Kap. 3.2.2.3.2, Abb. 3-11 C, S. 67), auch bei DP2 während der enzymatischen Modifikation mit His<sub>6</sub>-mTyr zur Ausbildung von TOPA (3,4,5-Trihydroxyphenylalanin) gekommen sein. Dies müsste jedoch in weiterführenden Analysen untersucht und verifiziert werden. Bislang ist in der Literatur keine

Hydroxylierung Peptid-gebundener Tyr in TE beschrieben. Aus diesem Grund wäre eine exakte Bestimmung der Hydroxylierungen in DP2 in künftigen Untersuchungen von großem Interesse. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF MS-Messungen von nicht-mod. und mod. DP2 in Tabelle 3-9 aufgelistet.

**Tabelle 3-9 Übersicht der detektierten Massen von DP2 aller Ladungszustände mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse (Die theoretische  $M_{\text{average}}$  von DP2 beträgt 67330,84 Da. Alle Angaben sind in Dalton (Da).**

Protein Ladungszustand	DP2		mod. DP2 (1)		mod. DP2 (2)	
	m/z <sub>observed</sub>	$M_{\text{Avg., exp.}}$	m/z <sub>observed</sub>	$M_{\text{Avg., exp.}}$	m/z <sub>observed</sub>	$M_{\text{Avg., exp.}}$
(M+H) <sup>+</sup>	67083,3	67082,3	67903,0	67902,0	67933,3	67932,3
(M+2H) <sup>2+</sup>	33599,4	67196,7	33994,8	67987,6	34007,9	68013,8
(M+3H) <sup>3+</sup>	22428,2	67281,5	22662,7	67985,2	22658,7	67973,0
Durchschnittliche Masse		67139,5		67958,3		67973,0
Standardabweichung		81,63		39,77		33,25
Entspricht folg. Anzahl an OH-Gruppen		-		51		52

### 3.3 Funktionelle Charakterisierung der Designer-Proteine

Für die Verwendung der Designer-Proteine (DP) als Bindemittel sind die funktionelle Charakterisierung sowie die mechanische Testung der Klebeeigenschaften notwendig. Diese Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt. Zur Testung der Funktionalität der DP wurden verschiedene Methoden verwendet. Zunächst sollten biochemische Analysen zur Untersuchung der Proteinstabilität, des Aggregationsverhaltens sowie der temperaturabhängigen strukturellen Veränderungen mit Bestimmung der Übergangstemperaturen ( $T_i$ ) durchgeführt werden. Diese Experimente wurden mittels nanoDSF (engl. *differential scanning fluorimetry*) analysiert und die Ergebnisse sind in Kap. 3.3.1 (S. 91) gezeigt.

Anschließend sollten die Bindemeisteeigenschaften der DP an der Oberfläche geprüft werden. Dafür wurden sowohl modifizierte als auch nicht-modifizierte Proteinvarianten miteinander verglichen, um den Einfluss von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) als post-translationale Modifikation in den DP zu untersuchen. Wie bereits in Kap. 1.3.1 (S. 9) beschrieben, wurde im Rahmen dieser Arbeit Sand als Testoberfläche gewählt. Diese hydrophile Oberfläche besteht vorwiegend aus Siliciumdioxid ( $\text{SiO}_2$ , Abb. 1-6, S. 9). Silica-Oberflächen oder auch Glimmer werden bevorzugt in der Klebstoffforschung als experimentelles Substrat eingesetzt, weil Mica atomar glatt ist und seine Oberflächenchemie gut reproduzierbar ist. Zunächst wurde die Proteinadsorption der DP im kleinen Maßstab an  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen mittels Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (QCM-D) gemessen (Kap. 2.2.7.1, S. 48). Ein Vorteil dieser Methode ist, dass kleinste Massenänderungen in Echtzeit bis in den Nanogramm-Bereich ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ) detektiert werden können und nur geringe Probenmengen notwendig sind [Rodahl et al., 1997]. Dadurch können Adsorptions- und Desorptionsprozesse von Proteinen (elektrostatische Anziehungskräfte, Van-der-Waals-Kräfte, H-Brückenbindungen & hydrophobe Wechselwirkungen) an Oberflächen detektiert werden [Höök et al., 2001]. Für die Untersuchungen der Adsorption der DP wurden  $\text{SiO}_2$ -Quarz-Sensoren (Mica) verwendet. Die Ergebnisse der Messungen sind in Kap. 3.3.2 (S. 96) gezeigt.

Schließlich erfolgte die Untersuchung der Zug-Scher-Kräfte ausgewählter Proteinvarianten nach der DIN EN 1465 Prüfvorschrift. In der Literatur werden Zug-Scher-Versuche zur Testung der Funktionalität eines proteinogenen Bindemittels vielfach eingesetzt [Brennan et al., 2017; Cha et al., 2009; Choi et al., 2012; Gim et al., 2008; Yang et al., 2013]. Die Ergebnisse der Zug-Scher-Versuche werden in Kap. 3.3.3 (S. 109) vorgestellt.

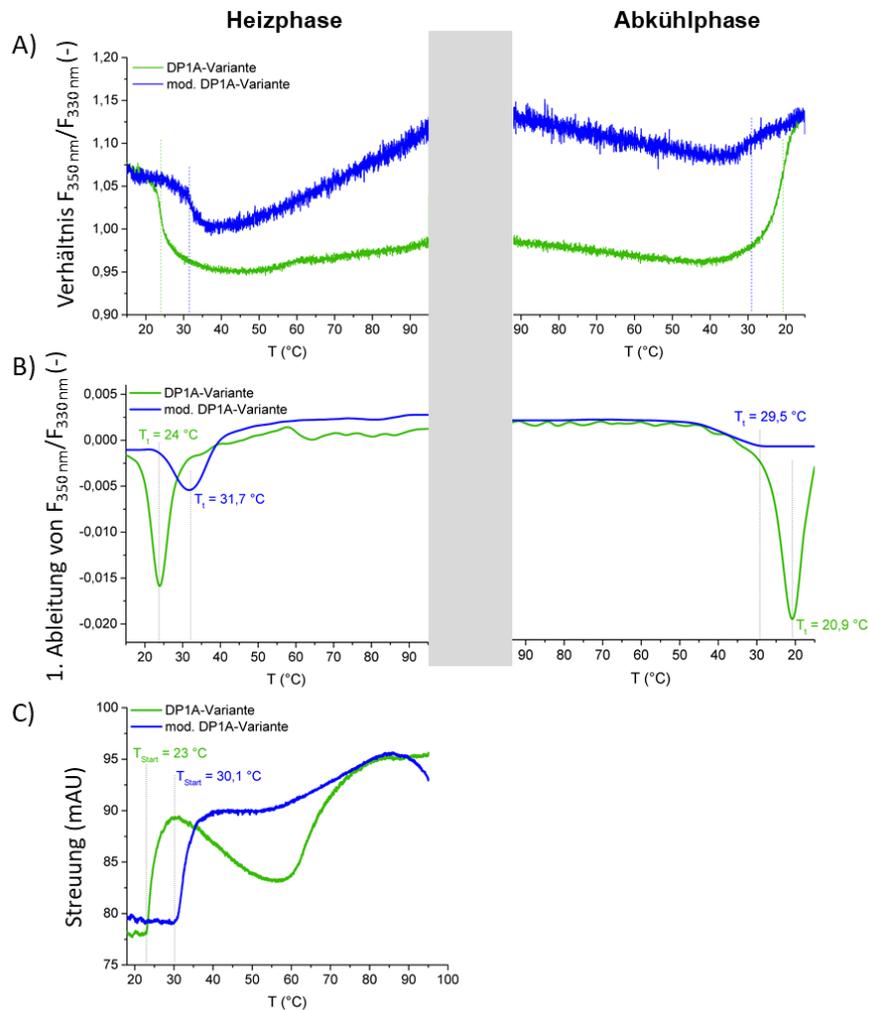
### 3.3.1 Thermodynamische Untersuchungen zur Stabilität der Designer-Proteine mittels nanoDSF (*differential scanning fluorimetry*)

Die Charakterisierung der thermischen Stabilität der gereinigten Designer-Proteine (DP), DP1A/B-Variante, DP2, Mefp-3 und Mgfp-3, erfolgte über automatisierte *differential scanning fluorimetry* (DSF)-Experimente. Die experimentellen Bedingungen sind in Kap. 2.2.6.2 (S. 44) beschrieben. Die DP wurden vergleichend jeweils ohne und mit Modifikation (DOPA) analysiert, um den Effekt der Hydroxylierung auf die thermodynamischen Eigenschaften der Proteine zu untersuchen. Die nanoDSF Untersuchungen für die DP1-Varianten wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TRIS, 300 mM NaCl, 0,5 M KCl (pH 8,0). Die DP1-Varianten enthalten als zentralen Protein-Block ELP. Eine Eigenschaft von ELP ist der Übergang von einer unstrukturierten Anordnung (*random-coil*) zu geordneten intra- und intermolekularen  $\beta$ -Helix-Strukturen ( $\beta$ -*spiral*) bei der sequenzspezifischen  $T_t$  [Girotti et al., 2004]. Diese Fähigkeit von ELP zur Strukturänderung wurde in der vorliegenden Arbeit bereits für die Reinigung der DP1-Varianten mittels ITC in dem genannten Puffersystem genutzt (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74). Im Folgenden ist repräsentativ das Ergebnis einer Messung pro DP1-Proteinvariante graphisch dargestellt. Die weiteren Messkurven befinden sich im Anhang (Kap. 8.2, S. 175).

In Abb. 3-23 A (S. 92) ist das Verhältnis der Fluoreszenzen bei 350 und 330 nm für die Temperaturübergänge der DP1A-Variante von 15 – 95 °C (Heizphase) und von 95 – 15 °C (Abkühlphase) gezeigt. Die Schmelzkurven zeigen einen sigmoidalen Verlauf mit einem Übergang, was für zwei strukturell verschiedene Zustände spricht. Die  $T_t$ -Werte werden basierend auf der Gibb's-Gleichung (Gl. 1, S. 44) am Wendepunkt (Markierungslinien) der sigmoidalen Kurven bestimmt. Bei dieser Temperatur liegen die Proteine theoretisch zu gleichen Teilen in beiden möglichen strukturellen Zuständen vor. Für eine bessere Visualisierung ermöglicht die NanoTemper Software „PR.ThermControl“ eine direkte Auswertung nach erster Ableitung der Übergangskurven. Hier beschreiben die Extrema den  $T_t$ -Wert. Für die DP1A-Variante (Abb. 3-23 B, grüne Kurven) liegt das Minimum und somit  $T_t$  bei 24 °C und für die modifizierte DP1A-Variante (blaue Kurven) bei 31,7 °C. Die Hydroxylierung der Tyr in der DP1A-Variante ruft eine Verschiebung von  $T_t$  um + 7,7 °C hervor und führt zu einem veränderten Verhalten der temperaturabhängigen Strukturänderung. In der Abkühlphase zeigt sich, dass dieser Prozess reversibel ist. Diese Eigenschaft des ELP-Blocks wurde während der Reinigung mittels ITC (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74) ausgenutzt. In der Abkühlphase erreichte die Fluoreszenz in allen Proben ihren Ausgangswert, was für eine vollständige Reversibilität der Strukturänderung der Proteine spricht. Die  $T_t$  sind vergleichbar mit denen aus der Heizphase (Abb. 3-23 B).

Neben der Bestimmung von  $T_t$  sollte das Aggregationsverhalten untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3-23 C gezeigt. Parallel zur Messung der Fluoreszenz wurde die Streuung in mAU im sichtbaren Wellenlängenbereich bestimmt. Durch die Reflexionstechnologie lässt sich der Beginn der Aggregation ( $T_{\text{Start}}$ ) laut Hersteller ab einer Partikelgröße > 25 nm messen. Für die DP1A-Variante (grüne Kurve) liegt  $T_{\text{Start}}$  bei 23 °C und für die mod. DP1A-

Variante (blaue Kurve) bei 30,1 °C. Auch bei dieser Messung zeigte sich der Einfluss der Hydroxylierung (DOPA) der DP1A-Variante. Mit Modifikation setzt die Aggregation des Proteins später ein.



**Abb. 3-23 Messung des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1A-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangstemperaturen ( $T_t$ )**

Vergleichend wurde die Veränderung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz der DP1A-Variante (grüne Kurven, s. Legende) und der modifizierten DP1A-Variante (blaue Kurven, s. Legende) analysiert. Untersucht wurde sowohl die Heiz- als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min im ITC-Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0). Für die Messungen wurde eine Anregung von 45 % gewählt. Alle Proben wurden in Triplikaten ( $n = 3$ ) gemessen (Abb. 8-18, S. 182). Zur Übersichtlichkeit wird eine aus drei Messungen gezeigt. A) Aufgetragen ist das Fluoreszenzverhältnis der beiden Wellenlängen ( $F_{350\text{nm}}/F_{330\text{nm}}$ ) gegen die Temperatur. B) Auftragung der 1. Ableitung aus den erfassten Daten aus A gegen die Temperatur. Aus den lokalen Extrema können die Übergangstemperaturen ( $T_t$ ) ermittelt werden (Angabe der  $T_t$  in der Abb.). C) Auftragung der Streuung in mAU gegen die Temperatur. Daraus lässt sich der Beginn der Aggregation ( $T_{\text{Start}}$ ) ablesen (Angabe der  $T_{\text{Start}}$  in der Abb.). Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).

Vergleichend wurde die DP1B-Variante mittels nanoDSF untersucht (Abb. 3-25, S. 94). In Abb. 3-25 A ist das Verhältnis der Fluoreszenzen bei 350 und 330 nm für die Heiz- und Abkühlphase gezeigt aus denen  $T_t$  bereits abgelesen werden kann (Markierungslinien). Aus der Auftragung der 1. Ableitung gegen die Temperatur erfolgte die Bestimmung von  $T_t$  (Abb. 3-25 B). In der Heizphase sind interessanterweise zwei lokale Minima pro Proteinvariante zu erkennen: DP1B-Variante (grüne Kurven) bei 24,7 °C ( $T_{t1}$ ) und 54,3 °C ( $T_{t2}$ ); mod. DP1B-Variante (blaue

Kurven) bei 25,5 °C ( $T_{t1}$ ) und 91,2 °C ( $T_{t2}$ ). Beim Vergleich der  $T_{t1}$  zeigte die Hydroxylierung der DP1B-Variante keinen großen Effekt (Verschiebung von  $T_t$  um + 0,8 °C). Im Gegensatz zur DP1A-Variante (Abb. 3-23 B) scheint die Modifikation (DOPA) kaum Einfluss auf die temperaturabhängige Strukturänderung zu haben. Allerdings zeigte die Hydroxylierung einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität zu Beginn jeder Messung. Im Mittel war diese mit Modifikation um  $\geq 100 \text{ counts} \cdot \text{mm}$  geringer. Die Fluoreszenzemission wird folglich durch die weitere Hydroxylgruppe in *ortho*-Position zur OH-Gruppe am Phenolring beeinflusst und es kommt zum *Quenching*. Dieser Zusammenhang konnte für alle untersuchten Proteine gezeigt werden (Tabelle 8-8, S. 187). In der Abkühlphase zeigte sich wie für die DP1A-Variante, dass dieser Prozess reversibel ist. Die Fluoreszenz erreichte in der Abkühlphase in allen Proben ihren Ausgangswert, was für eine vollständige Reversibilität der Strukturänderung der Proteine spricht. Die  $T_t$  sind vergleichbar mit denen aus der Heizphase (Abb. 3-25 B). Die Unterschiede in der temperaturabhängigen Strukturänderung beider DP1-Proteine sind vermutlich auf die verschiedenen Anhängen N- und C-terminal des ELP-Blocks zurückzuführen. Zur Veranschaulichung sind die DP1-Varianten als Einbuchstabencode in Abb. 3-24 dargestellt. Durch das Online-tool SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) unter Verwendung der Standardeinstellungen ergab das *multiple sequence alignment* der adhäsiven Mfp-3-Anteile (grün) folgende Resultate: N-Terminus, Identität 40 % und Ähnlichkeit 60 %; C-Terminus, Identität 91,66 % und Ähnlichkeit 91,66 %. Aus dieser Analyse ging hervor, dass sich die beiden Proteine vor allem im N-terminal signifikant unterscheiden.

#### DP1A-Variante



#### DP1B-Variante

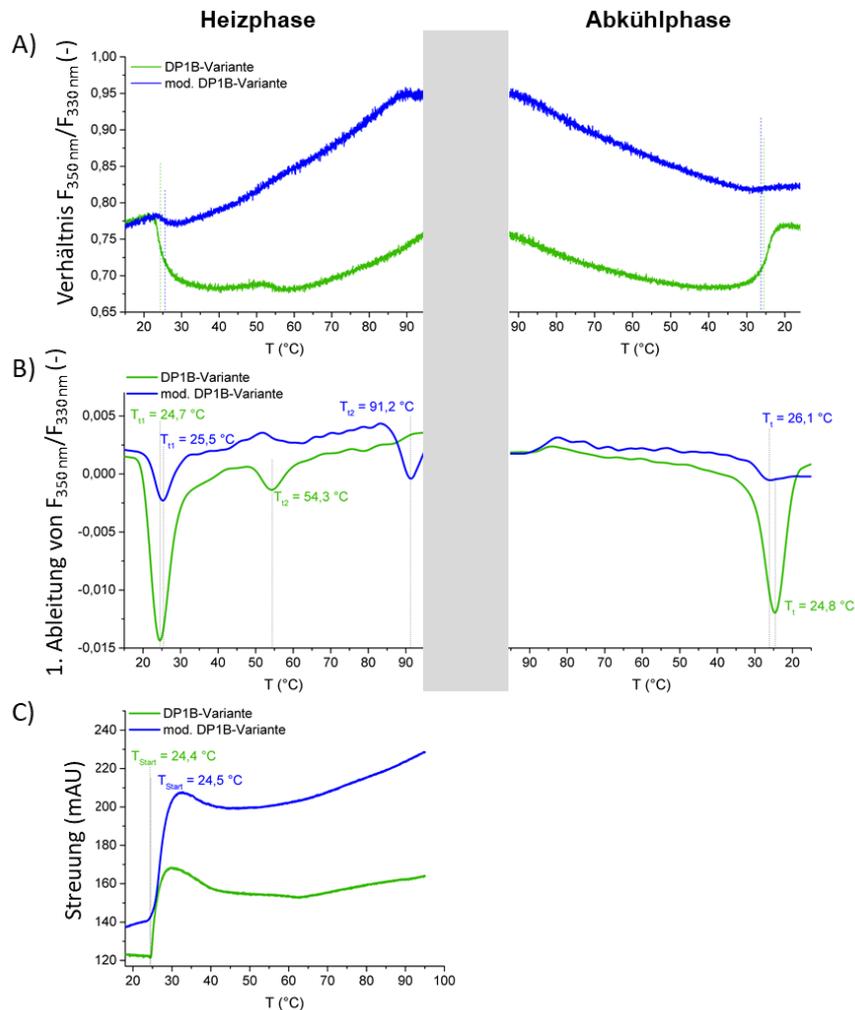


**Abb. 3-24 Mfp-3-Sequenzanteile N- und C-terminal des ELP-Blocks in den DP1-Varianten**

Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz der DP1A/B-Varianten nach Bestimmung der Proteintermini durch Edman-Sequenzierung und ISD/T3-Sequenzierung. Der C-Terminus der DP1B-Variante ist hypothetisch, da eine Sequenzierung nicht durchgeführt wurde. In MALDI-MS Messungen konnten jedoch eine Masse von 34608,11 Da nachgewiesen werden, die diese Sequenz bestätigte (Kap. 8.1.2, Abb. 8-4, S. 172). Aufgrund dieser Daten ist davon auszugehen, dass die Fragmentierung auch in der DP1B-Variante zwischen zwei basischen Aminosäuren stattfand (Tabelle 3-5, S. 78; Abb. 3-16, S. 79). Aufbau der Proteine: GGGGS-Linker (grau), Mfp-3-Sequenzanteil als adhäsiver Rest (grün) und ELP als kohäsiver Block (blau).

Die Ergebnisse zum Aggregationsverhalten sind in Abb. 3-25 C dargestellt. Für DP1B-Variante (grüne Kurve) liegt  $T_{\text{Start}}$  bei 24,4 °C und für die mod. DP1B-Variante (blaue Kurve) bei 24,5 °C. Auch bei dieser Analyse scheint die Modifikation (DOPA) von der DP1B-Variante kaum einen Effekt zu zeigen. Die Ursache liegt vermutlich an einer unterschiedlichen Verteilung der Proteinvarianten mit einer hohen Anzahl an Hydroxylierungen. Durch die Modifikation der Designer-Proteine mit der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) wird ein Proteingemisch erzeugt, welches für die DP1B-Variante, die vier Tyr enthält, Proteinvarianten mit theoretisch 1 – 4 zusätzlichen OH-Gruppen erzeugen kann. Dieser Zusammenhang wurde massenspektrometrisch für die Einzeldomäne Mefp-3 exemplarisch gezeigt. Nach chromatografischer Auftrennung der modifizierten Probe mittels HPLC liegt im Massenspektrum eine Verteilung unterschiedlich

hydroxylierter Proteinvarianten von Mefp-3 vor (Abb. 3-11, S. 67). Daher besteht die Annahme, dass diese Verteilung ebenfalls bei den modifizierten DP1A/B-Proben vorliegen kann. In der untersuchten Probe der modifizierten DP1B-Variante mittels nanoDSF war die Anzahl an Hydroxylierungen wahrscheinlich sehr gering, wodurch kaum Unterschiede zwischen dem modifizierten und nicht-mod. Protein messbar waren.



**Abb. 3-25 Messung des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1B-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangstemperaturen ( $T_t$ )**

Vergleichend wurde die Veränderung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz der DP1B-Variante (grüne Kurven, s. Legende) und der modifizierten DP1B-Variante (blaue Kurven, s. Legende) analysiert. Untersucht wurde sowohl die Heiz- als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min im ITC-Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0). Für die Messungen wurde eine Anregung von 100 % gewählt. Alle Proben wurden in Triplikaten ( $n = 3$ ) gemessen (Abb. 8-19, S. 183). Zur Übersichtlichkeit wird eine aus drei Messungen gezeigt. A) Aufgetragen ist das Fluoreszenzverhältnis der beiden Wellenlängen ( $F_{350\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$ ) gegen die Temperatur. B) Auftragung der 1. Ableitung aus den erfassten Daten aus A gegen die Temperatur. Aus den lokalen Extrema können die Übergangstemperaturen ( $T_t$ ) ermittelt werden (Angabe der  $T_t$  in der Abb.). C) Auftragung der Streuung in mAU gegen die Temperatur. Daraus lässt sich der Beginn der Aggregation ( $T_{\text{Start}}$ ) ablesen (Angabe der  $T_{\text{Start}}$  in der Abb.). Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).

Zusammenfassend wurde für beide DP1-Varianten eine geringere  $T_t$  bestimmt, als in der Literatur beschrieben [Desai et al., 2016]. Desai und Kollegen zeigten bei dem ELP mit 75 Penta-peptid-*repeats* (VPGVG) $_n$  einen Temperaturübergang ( $T_t$ ) bei 34 °C. Aufgrund der flankierenden Mfp-3-Anteile N- und C-Terminal der ELP-Sequenz in den DP1 (Abb. 3-16, S. 79) war

jedoch ein Einfluss auf die Strukturänderung als auch eine Verschiebung von  $T_t$  zu erwarten. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine negative Korrelation zwischen  $T_t$  und der Hydrophobizität des Fusionspartners besteht [Park und Won, 2009; Trabbic-Carlson et al., 2004]. Da der ELP-Phasenübergang durch hydrophobe Wechselwirkungen induziert wird, können auch flankierende Sequenzen die Strukturänderung des Proteins beeinflussen. Dieser Zusammenhang zeigt sich auch in den Resultaten der hydroxylierten DP1A-Variante. Die DOPA-Modifikation führte im Mittel zu einer Veränderung der intermolekularen Wechselwirkungen und Erhöhung von  $T_t$  auf  $\sim 32$  °C. Im Allgemeinen ist aus der Literatur bekannt, dass die Fluoreszenzintensität durch die Hydroxylierung von Tyr zu DOPA beeinflusst wird [Guo et al., 2020]. In der Studie von Ilamaran und Kollegen wurde der Einfluss von DOPA auf die Ausbildung der Tripelhelix in einem kollagenartigen Protein (CLP) mittels nanoDSF nachgewiesen [Ilamaran et al., 2020]. Die Daten zeigten für mod. CLP eine Verschiebung von  $T_t$  um  $+ 5$  °C und die Forscher postulierten, dass die Modifikation zu DOPA die Neigung zur Ausbildung einer Tripelhelix als auch die strukturelle Stabilität durch die erhöhte intermolekulare Vernetzung von CLP erhöht.

Neben den DP1A/B-Varianten wurden ebenfalls die Einzeldomänen Mefp-3 und Mgf-3 mittels nanoDSF analysiert. Bei Mfp-3 handelt es sich um kleine unstrukturierte Proteine. In den nanoDSF Analysen beider Proteine zeigten sich keine typischen Übergangskurven. Lediglich die Fluoreszenzintensität änderte sich im Verlauf des Temperaturgradienten und erreichte nach der Abkühlphase in allen Proben ihren Ausgangswert. Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse keine klassische Entfaltung bzw. mit Fluoreszenz nachweisbare Strukturänderung der Mfp-3 als auch keine Aggregation. Durch die Modifikation (DOPA) veränderte sich die Fluoreszenzintensität, wie zu erwarten war [Guo et al., 2020]. Die Ergebnisse sind dem Anhang (Kap. 8.2, Mefp-3: Abb. 8-21, S. 185; Mgf-3: Abb. 8-22, S. 186) zu entnehmen.

Abschließend wurde die thermische Stabilität von DP2 untersucht. DP2 lag als Proteingemisch vor, da durch die Reinigung mittels ITC (engl. *Inverse transition cycling*) verkürzte Proteinvarianten nicht abgetrennt werden konnten (Kap. 3.2.4.2, Abb. 3-20, S. 86, Spur 12). Die massenspektrometrische Analyse konnte bestätigen, dass es sich bei den anderen Proteinen um Spezies von DP2 handelt (Abb. 3-22, S. 89). Daher war für die Verwendung als Proteinkleber keine weitere Abtrennung der DP2-Varianten notwendig. Aufgrund dieser heterogenen Zusammensetzung der finalen Probe war jedoch eine gezielte nanoDSF-Analyse des Volllängenproteins (ohne verkürzte DP2-Varianten) nicht möglich. Die Ergebnisse der Analysen sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Abb. 8-20, S. 184). Im Allgemeinen zeigte die Probe eine geringe Sensitivität mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis. Aus diesem Grund war kaum eine Änderung in der Fluoreszenz und folglich eine strukturelle Änderung im Temperaturgradienten sichtbar (Abb. 8-20 A). Eine mögliche Erklärung lässt sich im Aufbau von DP2 (Kap. 3.1.1.3, S. 52) finden. DP2 enthält Tropoelastin (TE, Isoform-2) als kohäsiven Block. Als Besonderheit und Unterschied zum ELP-Block in den DP1A/B-Varianten, besteht TE aus hydrophilen (Lys- und Ala-Resten) und hydrophoben Domänen (repetitive Motive aus Gly, Val und Pro). Der temperaturresponsive ELP-Block in den DP1A/B-Varianten ist ausschließlich aus dem Pentapeptid-Repeat VPGVG<sub>75</sub> aufgebaut. Aus diesem Grund sind die intra- und intermolekularen Interaktionen aufgrund einer Temperaturänderung in den DP1-Varianten vermutlich stärker als in DP2. Zusätzlich werden in DP2 neben den Tyr im Mefp-3-Block auch Tyr im TE-Block von der His<sub>6</sub>-mTyr hydroxyliert (Abb. 3-22, S. 89). Diese zusätzlichen Modifikationen im kohäsiven Block von DP2 haben ebenfalls einen Einfluss auf die Struktureigenschaften, die messbare Fluoreszenz der Tyr/DOPA-Seitenketten sowie das Verhalten im Temperaturgradienten. Aus

der Darstellung der 1. Ableitung aus dem Verhältnis aus  $F_{350\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$  gegen die Temperatur zur Bestimmung von  $T_t$  war deutlich erkennbar, dass es sich um ein Proteingemisch handelt und aus diesem Grund ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis vorlag (Kap. 8.2, Abb. 8-20 B). Ebenfalls war keine messbare Aggregation des Proteins unter den getesteten Bedingungen nachweisbar (Abb. 8-20 C).

Abschließend sind die Ergebnisse der untersuchten DP1-Varianten zu den Temperaturübergängen ( $T_t$ ) und dem Beginn der Aggregation ( $T_{\text{start}}$ ) mittels nanoDSF tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 3-10, S. 96). Aufgelistet sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen ( $n = 3$ ) sowie deren Standardabweichung (SD). Insbesondere für die DP1A-Variante zeigte sich der Einfluss der Hydroxylierung (DOPA) auf den thermischen Übergang des Proteins. Die Modifikation innerhalb der DP1A-Variante rief eine Verschiebung von  $T_t$  um  $+ 7,7\text{ °C}$  hervor. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen in den DP1-Varianten durch die DOPA-Modifikation beeinflusst und verzögert wird. Des Weiteren zeigte die Modifikation der DP1A-Variante ein verändertes Aggregationsverhalten. Bei den modifizierten Proteinvarianten setzte die Aggregation erst bei höheren Temperaturen ein. Des Weiteren zeigte die Hydroxylierung der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA in allen Proben zu Beginn jeder Messung eine Abnahme der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den nicht-modifizierten Proteinen (Tabelle 8-8, S. 187). Erwartungsgemäß zeigten die Analysedaten, dass die zusätzliche Hydroxylgruppe in *ortho*-Position ein *Quenching* der Fluoreszenzemission auslöste. Dieser Zusammenhang ist bereits in der Literatur beschrieben [Guo et al., 2020].

**Tabelle 3-10 Zusammenfassung der ermittelten Temperaturübergänge ( $T_t$ ) und dem Beginn der Streuung (Aggregationsverhalten) der DP1-Proteine mittels nanoDSF. Gezeigt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (SD) aus drei Messungen ( $n = 3$ ).**

Zielprotein	$T_t$ (°C) in Heizphase		$T_t$ (°C) in Abkühlphase		$T_{\text{start}}$ Streuung (°C) bei Entfaltung	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
DP1A-Variante	23,97	0,058	20,97	0,058	23,03	0,115
mod. DP1A-Variante	31,57	0,153	29,17	0,306	30,39	0,266
DP1B-Variante	25,07	0,351	25,13	0,289	24,77	0,323
mod. DP1B-Variante	25,43	0,115	25,87	0,493	25,32	0,746

### 3.3.2 Untersuchung der Proteinadsorption der Designer-Proteine mittels QCM-D

Die Messungen zur Proteinadsorption erfolgten an einer Quarzkristallmikrowaage mit Bestimmung des Dissipationsfaktors (QCM-D). Der Versuchsaufbau erfolgte nach Literaturangaben [Petroni et al., 2015] und ist in Kap. 2.2.7.1 (S. 48) beschrieben. Für die Messungen wurden  $\text{SiO}_2$ -Quarzsensoren verwendet, da diese Oberfläche mit Mica (Verwendung in den Zug-Scher-Versuchen: Kap. 3.3.3, S. 109) vergleichbar ist. Sowohl Mica als auch Sand bestehen hauptsächlich aus  $\text{SiO}_2$  (Kap. 1.3.1, S. 9). Deshalb eignen sich  $\text{SiO}_2$ -Sensoren und Mica gut für Vorversuche im Hinblick auf die geplante Nutzung der Designer-Proteine (DP).

In Vorbereitung auf den Vergleich der Proteinadsorption der in der vorliegenden Arbeit produzierten DP, mit und ohne DOPA-Modifikation, sollte die QCM-Methode zunächst etabliert werden. Dafür wurde der Einfluss der Proteinkonzentration (Kap. 3.3.2.1, S. 97), der Applikationszeit (Kap. 3.3.2.2, S. 99) sowie der Messtemperatur (Kap. 3.3.2.3, S. 100) auf die Proteinadsorption an die  $\text{SiO}_2$ -Sensoroberfläche (OF) untersucht. Für diese Vorversuche wurde die

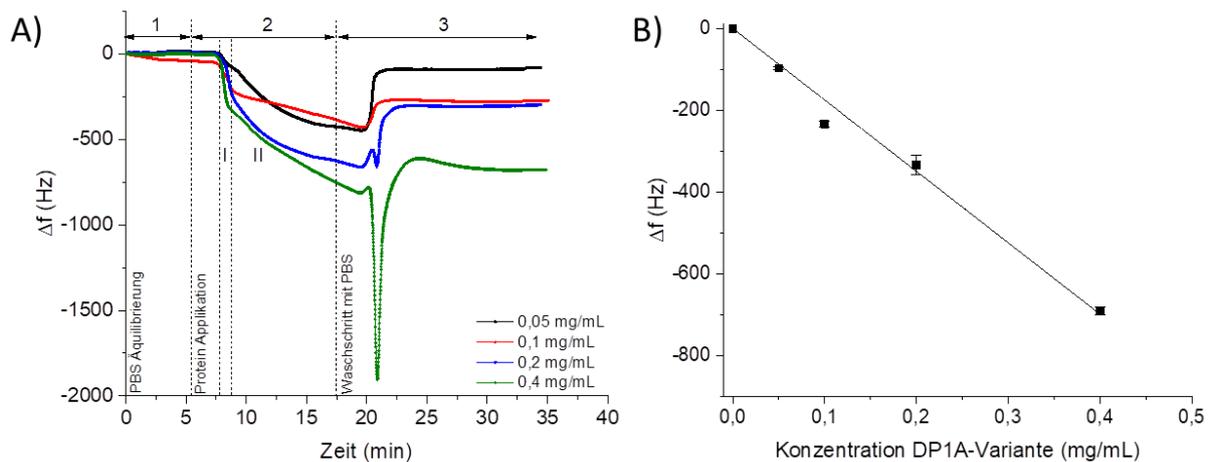
nicht-modifizierte DP1A-Variante ausgewählt, da das Protein den temperaturresponsiven ELP-Block als kohäsive Einheit (Abb. 3-1, S. 51) enthält und von einem Einfluss der Messtemperatur auszugehen war. Nach Etablierung und Festlegung der Messparameter erfolgte der Vergleich der Proteinadsorption ausgewählter DP auf die SiO<sub>2</sub>-Sensoren. Vergleichend wurden die Proteinvarianten mit und ohne DOPA-Modifikation untersucht (Kap. 3.3.2.4, S. 102).

### 3.3.2.1 Untersuchungen zum Einfluss der Konzentration

Zunächst wurde die Konzentrationsabhängigkeit der DP1A-Variante auf die Proteinadsorption untersucht. Dafür wurden folgende Protein-Stammlösungen in ITC-Puffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0) eingesetzt: 0,05; 0,1; 0,2 und 0,4 mg/mL. In Abb. 3-26 A sind die Adsorptionsverläufe der DP1A-Variante im Frequenzplot auf die SiO<sub>2</sub>-Sensoren gezeigt. Beispielhaft wurde eine Kurve pro Proteinkonzentration aufgetragen (Abb. 3-26 A Legende). Die Messung lässt sich in drei Schritte unterteilen: Äquilibrierung des Sensors mit PBS (1), Proteinapplikation (2) und finaler Waschschrift mit PBS (3). Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung. Die Startfrequenz ist nach der Äquilibrierung des Sensors mit PBS abzulesen. Im Anschluss erfolgte die Proteinapplikation und nach ca. 7,5 min begann die Beladung des Sensors mit Protein, was aus der starken Abnahme in der Frequenz hervorging. Darüber hinaus sind im Proteinapplikations-Schritt zwei Phasen (I + II) erkennbar. Zunächst war eine starke Frequenzänderung von Minute 8 – 9 messbar (I). In der 2. Phase (II) erfolgte eine Abflachung der Kurven (geringeres  $\Delta f$ ). Aus den Kurvenverläufen zum Adsorptionsverhalten lässt sich die Annahme ableiten, dass in der 1. Phase die Sensoroberfläche vollständig mit Protein benetzt wird (Adhäsion), während in der 2. Phase bereits Proteinschichten (*multilayer*) durch die Eigenschaften des kohäsiven ELP-Blocks zwischen den Proteinketten der DP1A-Variante ausgebildet werden. Nach 10-minütiger Proteinapplikation war die Ausbildung der Proteinschichten noch nicht abgeschlossen, da die Frequenz weiterhin abnahm. Dennoch wurde an dieser Stelle der finale Waschschrift mit PBS (3) gestartet, da der Einfluss der Applikationszeit separat in einem weiteren Experiment (Kap. 3.3.2.2, S. 99) betrachtet wurde. Interessanterweise wurde in diesem Schritt für die Proteinkonzentrationen von 0,05 mg/mL (schwarze Kurve), 0,1 mg/mL (rote Kurve) und 0,2 mg/mL (blaue Kurve) wieder ein Großteil des Proteins ausgewaschen, da die Frequenzänderung zunahm. Der finale Wert beim Erreichen eines stabilen Frequenzwertes (Endfrequenz) entsprach dabei dem  $\Delta f$  aus der 1. Phase (von Schritt 2) der Beladung der Sensoroberfläche mit Protein (Tabelle 3-11, S. 99, rechte Spalte). Somit war davon auszugehen, dass die gebildeten Proteinschichten während der Applikation wieder durch PBS heruntergewaschen wurden. Lediglich die Proteinschicht der Adhäsionsphase (Beladung der Sensoroberfläche, 8 – 9 min) blieb an der direkten SiO<sub>2</sub>-OF haften. Eine Ausnahme stellt die Messung mit 0,4 mg/mL Protein dar. Dort scheinen die beiden Phasen der Proteinapplikation (Schritt 2) ineinander überzugehen und das finale  $\Delta f$  ist höher als das  $\Delta f$  aus der 1. Phase (Beladung der Sensoroberfläche mit Protein). Somit blieb ein Teil der Proteinschichten (*multilayer*) erhalten. Dieses Resultat zeigte, dass die applizierte Proteinmenge einen Einfluss auf die Beladung des Sensors ausübt. Die finalen Frequenzänderungen aller Messungen sind in Tabelle 3-11 (S. 99) zusammengefasst.

Jedoch zeigten sich während der Waschphase (Schritt 3) mit PBS für 0,2 mg/mL (blaue Kurve) und 0,4 mg/mL (grüne Kurve) Frequenzausschläge. Bei der Probe mit 0,4 mg/mL ist dieser besonders deutlich. Die Ursache dafür liegt im konzentrationsabhängigen Aggregationsverhalten von DP1A. Im Verlauf der Messung bei 25 °C trat eine Trübung der Proteinlösungen in den Gefäßen auf, was die Hypothese der Proteinaggregation durch die starke Interaktion der

DP1A-Variante unter diesen Bedingungen stützt. Diese kleinen Proteinaggregate werden durch die Schläuche und die Messkammer gespült und verursachen, ohne direkt in Wechselwirkung zu treten, lokale Frequenzänderungen (eine erhöhte Masse auf dem Sensor). Da diese Proteinaggregate keine Interaktion zu den Sensor-gebundenen DP1A-Molekülen eingehen können, werden sie direkt wieder vom Sensor heruntergespült und es kommt zu einer Erhöhung der Frequenz bis zum Erreichen eines stabilen Frequenzwertes (Endfrequenz). Zusätzlich erfolgten Untersuchungen zur dynamischen Lichtstreuung (DLS) bei den verschiedenen Proteinkonzentrationen zur Überprüfung der Hypothese (Kap. 2.2.6.3, S. 45). Die Messungen bestätigten, dass es bei höheren Konzentrationen zur Ausbildung von Proteinaggregaten durch die starken intra- und intermolekularen Interaktionen bei der DP1A-Variante kommt und der PDI (Polydispersitätsindex) mit höherer Konzentration zunahm (Anhang, Kap. 8.2, Abb. 8-23, S. 187 und Tabelle 8-9, S. 188).



**Abb. 3-26 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Konzentration an DP1A-Variante**

Vergleich der Proteinadsorption der DP1A-Variante an  $\text{SiO}_2$ -Sensoren während einer Applikationszeit von 10 min, einer Flussrate von  $60 \mu\text{L}/\text{min}$  bei  $25^\circ\text{C}$ . A – Frequenzplot für die verschiedenen Konzentrationen (0,05 – 0,4 mg/mL DP1A-Variante). Es wird beispielhaft eine Kurve pro Proteinkonzentration gezeigt (s. Legende). Die Messung lässt sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibrierung des Sensors mit PBS, 2 – Proteinapplikation (I – 1. Phase, II – 2. Phase), 3 – Finaler Waschschrift mit PBS. Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung. B – Abhängigkeit der finalen Frequenzänderung ( $\Delta f$ ) von der eingesetzten Proteinkonzentration während der Messung ( $n = 3$ ). Die Messdaten aller Messungen sind Tabelle 3-11 zu entnehmen.

Der Zusammenhang zwischen der finalen Frequenzänderung ( $\Delta f$ ) und der Konzentration an DP1A-Variante ist Abb. 3-26 B dargestellt. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Frequenzänderungen aller untersuchten Konzentrationen und deren Standardabweichungen ( $n = 3$ ). Mit höherer Konzentration der Proteinlösung konnte eine größere finale Frequenzänderung erzielt werden. So wurde beispielsweise für eine Stammlösung von 0,05 mg/mL ein  $\Delta f$  von  $97,2 \pm 3,81$  Hz und für 0,4 mg/mL ein  $\Delta f$  von  $690,4 \pm 8,71$  Hz ermittelt. Die Frequenzänderungen aller Proteinkonzentrationen sind in Tabelle 3-11 (S. 99) zusammengefasst. Im Allgemeinen liegen die Fehleramplituden von QCM-Messungen mit Proteinen im Bereich von 5 – 15 % [Ausili et al., 2012; Chandrasekaran et al., 2013; Chen et al., 2010; Lord et al., 2006]. Die ermittelten Standardabweichungen (SD) liegen somit im Normbereich. Obwohl eine erhöhte Konzentration einen positiven Einfluss auf die Frequenzänderung und die Adhäsion zeigte, nahm zeitgleich auch die Löslichkeit ab, da die DP1A-Variante verstärkt intra- und intermolekulare Interaktionen einging. Die Ausbildung dieser Proteinaggregate führte zu ungewollten Frequenzausschlägen, die zufällig und nicht standardisierbar auftraten. Dies war durch eine Trübung der Proteinlösung ab einer Konzentration von 0,2 mg/mL zu beobachten und konnte durch DLS-

Messungen (Kap. 8.2, Abb. 8-23 und Tabelle 8-9, S. 188) bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Untersuchungen eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/mL gewählt, um aussagekräftige und verlässliche Datensätze und generieren.

**Tabelle 3-11 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen zur Konzentrationsabhängigkeit. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen (n = 3, SD = Standardabweichung). Zusätzlich sind beispielhaft die  $\Delta f$ -Werte aus der 1. Phase (von Schritt 2), der Beladung der Sensoroberfläche mit Protein aus Abb. 3-26 (S. 98) aufgeführt.**

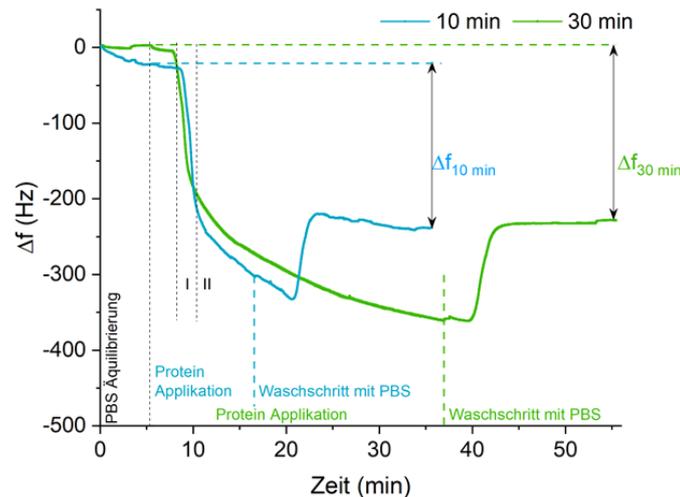
Konzentration der DP1A-Variante (mg/mL)	$\Delta f_1$ (Hz)	$\Delta f_2$ (Hz)	$\Delta f_3$ (Hz)	Mittelwert $\Delta f$ (Hz)	SD (Hz)	$\Delta f_{\text{Sensorbeladung}}$ (Hz)
0,05	100,97	97,17	93,36	97,17	3,81	92,32
0,1	233,54	239,92	226,07	233,18	6,93	192,62
0,2	331,88	357,57	311,43	333,63	23,12	306,37
0,4	680,45	694,24	696,56	690,42	8,71	321,27

### 3.3.2.2 Untersuchungen zum Einfluss der Applikationszeit

Anschließend wurde die Proteinapplikationszeit untersucht, um zu ermitteln ob eine längere Beladung des SiO<sub>2</sub>-Sensors zu einer höheren finalen Frequenzänderung ( $\Delta f$ ) führt. In Abb. 3-27 sind die Adsorptionsverläufe der DP1A-Variante im Frequenzplot auf die SiO<sub>2</sub>-Sensoren gezeigt. Zum Vergleich wurden 10 min und 30 min Proteinapplikation untersucht. Beispielhaft ist eine Kurve pro Applikationszeit dargestellt (s. Legende). Auch bei dieser Messung wird in die drei Schritte Äquilibrierung des Sensors mit PBS (1), Proteinapplikation (2), finaler Waschschritt mit PBS (3) unterteilt, mit der Variation 10 min und 30 min in Schritt 2. Die Startfrequenz ist nach der Äquilibrierung des Sensors mit PBS abzulesen. Im nachfolgenden Schritt der Proteinapplikation waren wie bereits in den Untersuchungen zur Proteinkonzentration in Kap. 3.3.2.1 zwei Phasen (I + II) erkennbar. Zunächst erfolgte eine starke Frequenzänderung von Minute 8 – 10 (Adhäsion – Benetzung der Sensoroberfläche mit Protein, phase I), gefolgt von einer Abflachung der Kurven (geringeres  $\Delta f$ , Kohäsion – Ausbildung von *multilayern*). Bei dem direkten Vergleich beider Applikationszeiten zeigte sich, dass auch nach 30 min die Frequenz kontinuierlich abnahm und es nicht zur Ausbildung eines stabilen  $\Delta f$  kam. Jedoch sind die finalen  $\Delta f$ -Werte nach dem PBS-Waschschritt vergleichbar. Dieser Wert ist demnach unabhängig von der Applikationszeit des Proteins (Tabelle 3-12, S.100). Bei einer Proteinapplikation von 10 min (Abb. 3-27, blaue Kurve) wurde im Durchschnitt eine finale Frequenzänderung von  $238,25 \pm 35,36$  Hz erhalten. Vergleichend dazu ergab eine Proteinapplikation von 30 min (Abb. 3-27, grüne Kurve) im Mittel ein  $\Delta f$  von  $246,89 \pm 25,32$  Hz. Die Ergebnisse aus der dreifach Bestimmung sind in Tabelle 3-12 (S.100) zusammengefasst. Anhand der Fehleramplituden liegen die finalen  $\Delta f$ -Werte im gleichen Bereich und unabhängig von der Applikationszeit ist ein vergleichbares Verhalten gegeben. Die Frequenzplots auf die SiO<sub>2</sub>-Sensoren aller Messungen sind dem Anhang (Kap. 8.2, Abb. 8-25, S. 189) zu entnehmen.

Wie bereits in Kap. 3.3.2.1 (S. 97) gezeigt, konnten auch in diesem Versuchsaufbau zwei Phasen zum Adsorptionsverhalten der DP1A-Variante in den Kurvenverläufen beobachtet werden (Phase 1 – Adsorption, Phase 2 - Kohäsion). Anhand der QCM-Daten ist die Ausbildung der Proteinschichten nach 30-minütiger Applikationszeit noch nicht abgeschlossen, da die Frequenz weiterhin abnahm. Dieser Zusammenhang wurde jedoch nicht weiter untersucht, da aus dem darauffolgenden Waschschritt ersichtlich war, dass diese Proteinschichten durch PBS unter den getesteten Bedingungen wieder gelöst werden konnten. Die finalen  $\Delta f$ -Werte, die

die adsorbierte Menge an Protein widerspiegeln, lagen unabhängig von der Applikationszeit (10 oder 30 min) im gleichen Bereich.



**Abb. 3-27 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Applikationszeit der DP1A-Variante während der QCM-Messung**

Frequenzplot zum Vergleich der Proteinadsorption der DP1A-Variante an  $\text{SiO}_2$ -Sensoren während einer Applikationszeit von 10 min (blaue Kurve) und 30 min (grüne Kurve). Es wird beispielhaft eine Kurve pro Applikationszeit gezeigt (s. Legende). Die Messung lässt sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibrierung des Sensors mit PBS (für die beiden Applikationszeiten identisch), 2 – Proteinapplikation für die beiden Applikationszeiten farblich gekennzeichnet (I – 1. Phase, II – 2. Phase), 3 – Finaler Waschschrift mit PBS (für die beiden Applikationszeiten farblich gekennzeichnet). Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung. Die Messdaten aller Messungen sind Tabelle 3-12 zu entnehmen.

**Tabelle 3-12 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen zur Abhängigkeit von der Applikationszeit der DP1A-Variante. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen (n = 3, SD = Standardabweichung).**

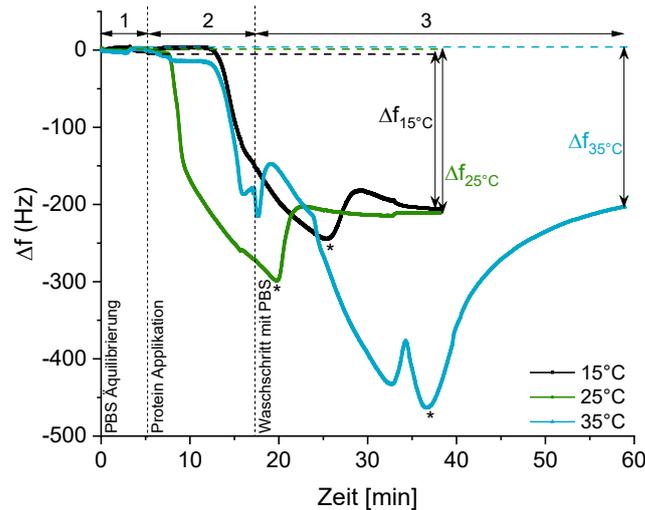
Applikationszeit (min)	$\Delta f_1$ (Hz)	$\Delta f_2$ (Hz)	$\Delta f_3$ (Hz)	Mittelwert $\Delta f$ (Hz)	SD (Hz)
10	222,47	213,5	278,75	238,25	35,36
30	226,07	239,53	275,08	246,89	25,32

Zusammenfassend zeigte dieser Versuch, dass die Applikationszeit keinen signifikanten Einfluss auf die finale Frequenzänderung hat. Das Adhäsionsverhalten auf die  $\text{SiO}_2$ -OF war unabhängig von der Dauer der Applikation. Zudem zeigte auch das Kohäsionsverhalten keinen Einfluss auf das finale  $\Delta f$ . Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche zum Verhalten der Proteinadsorption der DP mittels QCM eine Dauer von 10 min festgelegt.

### 3.3.2.3 Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zum Einfluss der Temperatur auf das Adsorptionsverhalten der DP1A-Variante auf  $\text{SiO}_2$ -Sensoroberflächen (OF) gezeigt. Aufgrund des temperaturresponsiven ELP-Blocks als kohäsive Einheit in der DP1A-Variante (Abb. 3-1, S. 51) war die Untersuchung der Proteinadsorption bei verschiedenen Temperaturen von großem Interesse. Wie bereits in den vorangestellten Kapiteln erläutert, wurde für die Messung eine Proteinkonzentration von 0,1 mg/mL in ITC-Puffer (Kap. 3.3.2.1, S. 97) und eine Applikationszeit von 10 min (Kap. 3.3.2.2, S. 99) festgelegt. Für die Messreihen wurden folgende Temperaturen untersucht: 15 °C, 25 °C und 35 °C. Durch die externe Probenkammer (LiquiBox) des q.Cell T Systems (3T Analytik GmbH) konnte sowohl eine konstante Temperatur der Proben

und Puffer als auch der Durchflusszelle während der Messung gewährleistet werden. Beispielhaft ist eine Kurve pro Applikationstemperatur dargestellt (Abb. 3-28, S. 102, Legende). Bei den Messungen konnten unabhängig von der Temperatur die zwei Phasen der Proteinadsorption der DP1A-Variante auf die SiO<sub>2</sub>-OF beobachtet werden. Wie bereits in den vorherigen Kapiteln beschrieben, ist davon auszugehen, dass in der 1. Phase die SiO<sub>2</sub>-OF vollständig mit Protein benetzt wird (Adhäsion), während in der 2. Phase inter- und intramolekulare Proteinschichten (*multilayer*) durch den kohäsiven ELP-Block der DP1A-Variante ausgebildet werden. Bei den verschiedenen Messtemperaturen ist zu beachten, dass die Oszillation des Schwingquarzes bereits durch den Temperaturunterschied beeinflusst wird und zu einer Frequenzverschiebung führt [Lee et al., 2020; Walls und Gagnepain, 1992; Wessels et al., 2013]. Insgesamt wurden in diesem Experiment vergleichbare finale  $\Delta f$ -Werte unabhängig von der Temperatur nach dem PBS-Waschschritt gemessen (Tabelle 3-13, S. 102). Die Temperatur scheint demnach keinen Einfluss auf die Benetzung der Sensoren mit Protein (Adhäsion) zu haben. Dennoch sind Unterschiede vor allem im Kurvenverlauf der 2. Phase des 2. Schritts der Proteinadsorption zu erkennen. Dies lässt Rückschlüsse auf das Kohäsionsverhalten der DP1A-Variante zu. Bei einer Temperatur von 15 °C (schwarze Kurve) wurde nach 10-minütiger Proteinapplikation eine maximale Frequenzänderung von 243 Hz (Kennzeichnung durch \*) erhalten. Bei 25 °C (grüne Kurve) waren es im Verlauf der Messung bereits 298 Hz (Kennzeichnung durch \*). Eine Ausnahme stellt allerdings die Messung bei 35 °C (blaue Kurve) dar. Wie anhand des Kurvenverlaufs zu erkennen, sind Schwankungen während der QCM-Messung aufgetreten. Diese Schwankungen sind durch die bereits im Probengefäß entstehenden Proteininteraktionen zu begründen. Die Proteinlösung ( $c = 0,1 \text{ mg/mL}$ ) im Reaktionsgefäß war bei 35 °C trüb. Bei dieser Temperatur kommt es durch den ELP-Teil der DP1A-Variante zu intra- und intermolekularen Interaktionen. Dieser Zusammenhang wurde in dieser Arbeit bereits in den Messungen mittels nanoDSF bestätigt (Kap. 3.3.1, Abb. 3-23 C, grüne Kurve, S. 92). Der Beginn der Aggregation konnte durch die Zunahme der Lichtstreuung bei 23 °C nachgewiesen werden. Demzufolge liegen die Proteine bei 35 °C hauptsächlich als Proteinagglomerate vor. Bei 35 °C (Abb. 3-28, S. 102, blaue Kurve) während der QCM-Messung wurde eine maximale Frequenzänderung von 462 Hz (Kennzeichnung durch \*) beobachtet. Neben der Ausbildung von Proteinschichten kann dieses  $\Delta f$  ebenfalls auf eine Ablagerung von Proteinagglomeraten zurückzuführen sein, die sich während der Messung auf dem Sensor ablagern, jedoch leicht mit PBS wieder abgespült werden können. Je nach Zugänglichkeit der Proteinanteile, die für die Adsorption an den Sensor verantwortlich sind bzw. je nach Anteil bereits entstehender Aggregate deren Größe variieren kann, zeigt sich eine inhomogene Wechselwirkung mit dem Sensor. Aus diesem Grund ergaben die Messungen bei 35 °C im Durchschnitt keine erhöhten finalen  $\Delta f$ -Werte im Vergleich zu den geringeren Temperaturen ( $\Delta f_{15^\circ\text{C}} = 212,94 \text{ Hz}$ ;  $\Delta f_{25^\circ\text{C}} = 233,18 \text{ Hz}$ ;  $\Delta f_{35^\circ\text{C}} = 236,08 \text{ Hz}$ ). Die Ergebnisse aus der dreifach Bestimmung sind in Tabelle 3-13 (S. 102) zusammengefasst und die Frequenzplots aller Messungen sind dem Anhang (Kap. 8.2, Abb. 8-26, S. 189) zu entnehmen.



**Abb. 3-28 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Temperatur während der QCM-Messung**

Frequenzplot zum Vergleich der Proteinadsorption der DP1A-Variante an  $\text{SiO}_2$ -Sensoren während einer Applikationszeit von 10 min bei verschiedenen Messtemperaturen (15 °C – schwarze Kurve, 25 °C – grüne Kurve, 35 °C – blaue Kurve). Es wird beispielhaft eine Kurve pro Messtemperatur gezeigt (s. Legende). Die Messung lässt sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibration des Sensors mit PBS, 2 – Proteinapplikation, 3 – Finaler Waschschrift mit PBS. Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung. Die Messdaten aller Messungen sind Tabelle 3-13 zu entnehmen.

Durch die starken Interaktion des Proteins bei 35 °C und das Vorhandensein von Mikroaggregaten, sind die Ergebnisse dieser Messungen nicht verlässlich. Anhand der dreifach Bestimmung ist ersichtlich, dass die finalen  $\Delta f$ -Werte mit einer Standardabweichung von 159,08 Hz stark variieren (Tabelle 3-13, S. 102). Obwohl die Daten aus den Analysen mittels nanoDSF bereits den Beginn der Aggregation bei 23 °C zeigten (Kap. 3.3.1, Abb. 3-23 C, grüne Kurve, S. 92), konnte auch in diesem Experiment mittels QCM dieses Aggregationsverhalten der DP1A-Variante bestätigt werden.

**Tabelle 3-13 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen zur Temperaturabhängigkeit. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen (n = 3, SD = Standardabweichung).**

Messtemperatur (°C)	$\Delta f_1$ (Hz)	$\Delta f_2$ (Hz)	$\Delta f_3$ (Hz)	Mittelwert $\Delta f$ (Hz)	SD (Hz)
15	212,97	204,41	221,43	212,94	8,51
25	233,54	239,92	226,07	233,18	6,93
35	204,3	95,29	408,66	236,08	159,08

### 3.3.2.4 Vergleichende Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten von Designer-Proteinen auf $\text{SiO}_2$ -Oberflächen

Nach erfolgreicher Etablierung der Messparameter mit der DP1A-Variante wurde das Adsorptionsverhalten der Designer-Proteine (DP) ohne und mit DOPA-Modifikation untersucht. In den vorangestellten Kapiteln wurde der Einfluss der Proteinkonzentration (Kap. 3.3.2.1, S. 97), der Applikationszeit (Kap. 3.3.2.2, S. 99) sowie der Messtemperatur (Kap. 3.3.2.3, S. 100) auf die Proteinadsorption der DP1A-Variante an die  $\text{SiO}_2$ -Sensoroberfläche (OF) gezeigt. Daraus ergaben sich final folgende Parameter, die für die QCM-Messungen ausgewählter DP festgelegt wurden: 0,1 mg/mL Proteinlösung und 10 min Proteinapplikation bei 25 °C. Die experimentellen Bedingungen für den Vergleich der DP sind in Kap. 2.2.7.1 (S. 48) beschrieben.

#### 3.3.2.4.1 Untersuchungen zur Proteinadsorption der Designer-Proteine

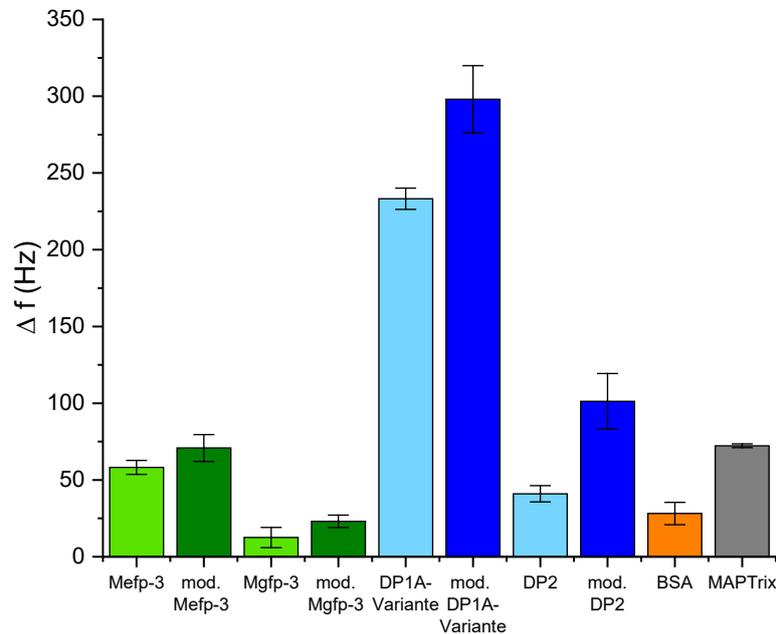
Vergleichend wurden die Proteinvarianten Mefp-3, Mgfp-3, DP1A-Variante und DP2 ohne und mit DOPA-Modifikation untersucht. Basierend auf der Aufarbeitung sowie dem nach den jeweiligen Proteineigenschaften beruhenden Löslichkeitsverhalten, lagen die Proteine in verschiedenen Puffern vor. Aufgrund der Löslichkeit konnten die rekombinanten Mfp-3-Proteine nur in 5 % HAc (Mefp-3) und 25 % HAc (Mgfp-3) in Lösung gebracht werden. Auch in der Natur befinden sich die Mfp in einem sauren Milieu in der Muschelsekretionsdrüse, die einen pH-Wert von ca. 5,5 besitzt [Yu et al., 2011a]. Alle Proteinproben wurden entsprechend Tabelle 2-22 (S. 49) bereitgestellt. Als Negativkontrolle diente eine Stammlösung von 1 mg/mL BSA in PBS. MAPTriX™ wurde als Positivkontrolle verwendet. MAPTriX™ ist eine kommerziell erhältliche Matrix auf der Basis von adhäsiven Muschelfußproteinen (Mfp). Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein, welches neben Mfp-3 und Mfp-5 auch Anteile des Kollagen-ähnlichen Mfp-1 enthält (vgl. Abb. 1-8, S. 13 und Tabelle 1-2, S. 13). Aus diesem Grund ist MAPTriX™ ebenfalls ein designtes Protein bestehend aus adhäsiven und kohäsiven Anteilen.

Die Ergebnisse der gemittelten finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) sind in einem Säulendiagramm und tabellarisch dargestellt (Abb. 3-29, S. 104 und Tabelle 3-14, S. 105). Die Frequenz- und Dissipationsplots aller Messungen sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Kontrollen: Abb. 8-28, S. 190; Mfp-3: Abb. 8-29, S. 191, DP: Abb. 8-30, S. 192). Betrachtet man das Adsorptionsverhalten der adhäsiven Einzelblöcke (Abb. 3-29, hellgrüne Säulen) an die SiO<sub>2</sub>-OF zeigt sich, dass Mefp-3 (*M. edulis*) eine größere Frequenzänderung mit 58,19 Hz ( $\pm 4,58$  Hz) als Mgfp-3 (*M. galloprovincialis*) mit 12,53 Hz ( $\pm 6,62$  Hz) hervorruft. Wie bereits gezeigt, besitzen die beiden Proteine (Mefp-3 & Mgfp-3) eine Sequenzähnlichkeit von 58,3 % (Kap. 1.4.1.1.1, Abb. 1-9, S. 15). Demnach ist das unterschiedliche Adsorptionsverhalten der beiden Proteine sehr interessant und lässt auf einen Einfluss des in Abb. 1-9 (S. 15) gelb unterlegten Sequenzbereiches –RYN– in Mefp-3 schließen. Darüber hinaus führte die Modifikation der Tyr zu DOPA (Abb. 3-29, dunkelgrüne Säulen) in den Proteinsequenzen zu einer verbesserten Adsorption. Für modifiziertes Mefp-3 konnte im Durchschnitt ein  $\Delta f$  von 70,84 Hz ( $\pm 8,76$  Hz) erhalten werden und für mod. Mgfp-3 23,03 Hz ( $\pm 4,05$  Hz). In beiden Fällen führte die Funktionalisierung durch die Einführung weiterer Hydroxylgruppen in die Mfp-3 zu einer stärkeren Frequenzänderung um ca. 11 Hz.

Im Vergleich dazu zeigt die DP1A-Variante (Abb. 3-29, blaue Säulen) unter den getesteten Bedingungen ein deutlich besseres Adsorptionsverhalten. Die finale Frequenzänderung der unmod. Proteinvariante (hellblaue Säule) betrug im Mittel 233,18 Hz ( $\pm 6,93$  Hz). Durch die Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA konnte die Proteinadsorption an die SiO<sub>2</sub>-OF auf ca. 300 Hz (dunkelblaue Säule) erhöht werden. Somit zeigte der zusätzliche ELP-Block in der DP1A-Variante, der zur Ausbildung der kohäsiven Interaktionen beiträgt, einen positiven Effekt auf das Adsorptionsverhalten im Vergleich zum Mefp-3 Einzelblock.

Betrachtet man die Ergebnisse von DP2, welches ebenfalls adhäsive und kohäsive Proteinblöcke enthält, konnte dieser Effekt nicht im gleichen Maße gezeigt werden. Im Gegensatz zur DP1A-Variante basiert DP2 auf Tropoelastin (TE, Isoform 2) als kohäsiven Proteinanteil (Abb. 3-1, S. 51). Die Messungen mit DP2 ergaben durchschnittlich ein finales  $\Delta f$  von 41,03 Hz ( $\pm 5,28$  Hz) und liegen damit unterhalb der  $\Delta f$ -Werte von Mefp-3. Nach Analyse des DOPA-modifizierten DP2 konnte ein Wert von 101,3 Hz ( $\pm 18,03$  Hz) bestimmt werden. DP2 erfuhr demnach mehr als eine Verdopplung des  $\Delta f$ -Wertes bzw. der Adsorptionsstärke. Bei keinem anderen Designer-Protein war der Effekt der Modifikation so stark zu sehen wie bei DP2. Neben den Tyr im Mefp-3-Block befinden sich auch 15 Tyr im TE-Block von DP2. Es ist davon auszugehen, dass die Hydroxylierung TE-enhaltener Tyr zu DOPA ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Adsorption von DP2 an die SiO<sub>2</sub>-OF hervorrief. Die insgesamt geringere

Adsorptionsstärke ( $\Delta f$ ) des DP2-Proteins könnte darauf zurückzuführen sein, dass unter den getesteten Bedingungen die intra- und intermolekularen Interaktionen im TE-Block sehr stark ausgeprägt waren. Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Parametern (Pufferbedingung, Temperatur) sind notwendig, um diesen Sachverhalt näher zu charakterisieren.



**Abb. 3-29 Proteinadsorption der Designer-Proteine an Sensoren mit SiO<sub>2</sub>-Oberfläche**

QCM-Messungen zur finalen Frequenzänderung ( $\Delta f$ ) der verschiedenen DP: Mefp-3, Mgfp-3, DP1A-Variante und DP2 ( $n = 3$ ). Die Proteinlösungen mit einer Konzentration von je 0,1 mg/mL im jeweiligen Puffer (Tabelle 2-22, S. 49) wurden mit einer konstanten Flussrate von 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei 25 °C für 10 min injiziert. Vergleichend ist das Adsorptionsverhalten an SiO<sub>2</sub>-Sensoroberflächen adhäsiver Einzelblöcke (grüne Säulen) als auch von DP aus einer Kombination adhäsiver und kohäsiver Protein-Blöcke (blaue Säulen) gezeigt. Die jeweilige modifizierte Proteinvariante (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase) ist gekennzeichnet und im entsprechenden dunkleren Farbton gezeigt. BSA (orange Säule) diente als Negativkontrolle und MAPTriX™ (graue Säule) als Positivkontrolle.

Im Vergleich ergaben die Kontrollen folgende Resultate. Die Positivkontrolle MAPTriX™ (graue Säule) zeigte im Durchschnitt eine finale Frequenzänderung von 72,28 Hz ( $\pm 1,25$  Hz). Dieses Ergebnis ist mit den Daten von mod. Mefp-3 (70,84  $\pm 8,76$  Hz) vergleichbar. Der Einfluss des Kollagen-ähnlichen Mfp-1 in MAPTriX™ als kohäsiver Proteinanteil ist nicht so stark, wie der des ELP-Blocks in der DP1A-Variante. Das in dieser Arbeit produzierte rekombinante Mefp-3 als adhäsiver Einzelblock zeigte in modifizierter Form ein ähnliches Verhalten wie das kommerziell erworbene MAPTriX™.

Als Negativkontrolle wurde, auch für den Vergleich mit der Literatur, BSA (orange Säule) untersucht. Da nicht von besonderen oder starken Adsorptionseigenschaften auszugehen war, wurde das Protein in einer Konzentration von 1 mg/mL in PBS, also 10-fachen Überschuss, eingesetzt. Das finale  $\Delta f$  betrug 28,17 Hz ( $\pm 7,281$  Hz). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Referenzdaten für Gold-beschichtete QCM-Sensoren ( $\sim 30$  Hz) [Kim et al., 2018]. Im Vergleich zu den DP zeigte lediglich Mgfp-3 ( $c = 0,1$  mg/mL) etwas geringere  $\Delta f$ -Werte als BSA.

Zusammenfassend lieferten die Resultate der QCM-Messungen vielversprechende Ergebnisse für die Grundidee des Protein-Designs mit einer Kombination aus kohäsiven und adhäsiven Protein-Blöcken. Aus den Daten zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der DP auf Sensoren mit SiO<sub>2</sub>-OF konnte die Arbeitshypothese in der vorgelegten Arbeit erfolgreich

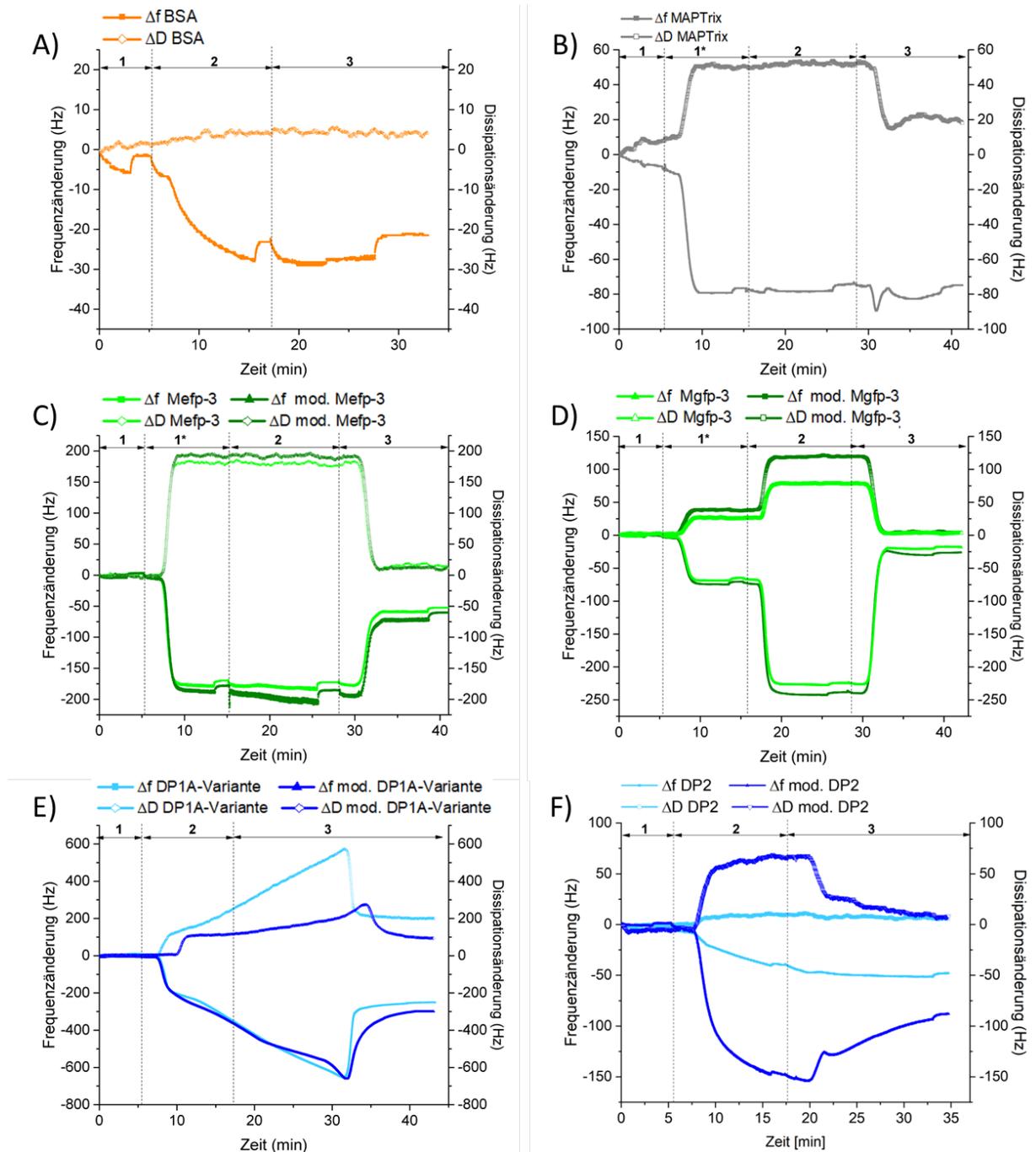
bestätigt werden. Adhäsive Blöcke ermöglichen die Haftung an Oberflächen, während die kohäsiven Blöcke zur inneren Festigkeit und Stabilität beitragen. Es wurde gezeigt, dass eine Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken in der DP1A-Variante (~ 240 Hz) zu einer verbesserten Adsorption im Vergleich zu den adhäsiven Mfp-3-Einzelblöcken (~ 25 Hz) führt und somit die Adsorption um Faktor 9,6 erhöht werden konnte. Durch die post-translationale Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr innerhalb der DP zu DOPA durch die in der Arbeit rekombinant hergestellte mikrobielle Tyrosinase (Kap. 3.2.1.2, S. 54), konnte zusätzlich ein positiver Effekt auf die Bindung an die SiO<sub>2</sub>-Sensoren nachgewiesen werden. Der positive Einfluss von Hydroxylierungen in der Proteinsequenz konnte für alle getesteten DP auf die Adsorption an die hydrophile Sensoroberfläche bestätigt werden. Diese Ergebnisse bieten eine vielversprechende Grundlage für die materialwissenschaftlichen Untersuchungen zu den Zug-Scher-Kräften der Designer-Proteine an der Zwick/Roell-Maschine, die in Kapitel 3.3.3 (S. 109) vorgestellt werden.

**Tabelle 3-14 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen der Designer-Proteine und deren modifizierten (mod.) Proteinvarianten (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase). Parameter der Proteinapplikation: Konzentration = 0,1 mg/mL im jeweiligen Puffer (Tabelle 2-22, S. 49) mit Ausnahme von BSA = 1 mg/mL, Flussrate = 60 µL/min, T = 25 °C, t = 10 min. Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse aus drei Messungen (n = 3, SD = Standardabweichung).**

Protein	$\Delta f_1$ (Hz)	$\Delta f_2$ (Hz)	$\Delta f_3$ (Hz)	Mittelwert $\Delta f$ (Hz)	SD (Hz)
Mefp-3	55,92	55,2	63,46	58,19	4,575
mod. Mefp-3	63,48	80,53	68,51	70,84	8,761
Mgfp-3	19,61	11,46	6,51	12,53	6,615
mod. Mgfp-3	27,37	22,38	19,35	23,03	4,050
DP1A-Variante	233,54	239,92	226,07	233,18	6,932
mod. DP1A-Variante	293,18	278,98	321,95	298,04	21,893
DP2	44,63	43,48	34,97	41,03	5,277
mod. DP2	88,96	92,95	122	101,30	18,035
Negativ Kontrolle: BSA	33,04	31,67	19,8	28,17	7,281
Positiv Kontrolle: MAPTriX™	70,89	73,32	72,63	72,28	1,252

#### 3.3.2.4.2 Untersuchungen zum Dissipationsverhalten der Designer-Proteine

Parallel zur Proteinadsorption wurde mit dem QCM-D Gerät qCell T (3T-Analytik) das Dissipationsverhalten der Designer-Proteine (DP) bestimmt (Kap. 2.2.7.1, S. 48). Beim Abschalten der Stromversorgung liefert die Änderung der Energiedissipation aus dem System ( $\Delta D$ ) Informationen über die viskoelastischen Eigenschaften der jeweiligen Probe [Edvardsson et al., 2005]. Dabei sind weiche, hoch viskoelastische Moleküle bzw. Molekülschichten in der Lage, das Ausschwingverhalten des Quarzes stärker zu beeinflussen als starre kleine Moleküle bzw. Molekülschichten, welche durch die Interaktion mit der Umgebung z. B. durch Reibung nur eine geringe Energiedämpfung verursachen. Für die Messungen wurden wie bereits in Kapitel 3.3.2 (S. 96) erläutert SiO<sub>2</sub>-Sensoren verwendet.



**Abb. 3-30** Dissipationsverhalten der Designer-Proteine an Sensoren mit SiO<sub>2</sub>-Oberfläche

Dissipationsverhalten ( $\Delta D$ ) der verschiedenen Designer-Proteine (DP) zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften während einer Applikationszeit von 10 min, einer Flussrate von 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei 25 °C, Proteinkonzentration 0,1 mg/mL im entsprechenden Puffer (Tabelle 2-22, S. 49), BSA 1 mg/mL. Es wird beispielhaft ein Frequenz- und Dissipationsplot pro Protein gezeigt (s. Legende). Die Messung lässt sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibration des Sensors mit PBS, 1\* – Äquilibration des Sensors mit 5 % HAC bei den Muschelfußproteinen, 2 – Proteinapplikation, 3 – Finaler Waschschritt mit PBS. Vergleichend ist das Dissipationsverhalten an SiO<sub>2</sub>-Sensoroberflächen adhäsiver Einzelblöcke (grüne Kurven) als auch von DP aus einer Kombination adhäsiver und kohäsiver Protein-Blöcke (blaue Kurven) gezeigt. Die jeweilige modifizierte Proteinvariante (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase) ist gekennzeichnet und im entsprechenden dunkleren Farbton gezeigt. BSA (orange Kurven) diente als Negativkontrolle und MAPTriX™ (graue Kurven) als Positivkontrolle. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Messungen sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Kontrollen: Abb. 8-28, S. 190; Mfp-3: Abb. 8-29, s. 191, DP: Abb. 8-30, S. 192).

Die Daten aus drei unabhängigen Messungen pro Proteinvariante sind in einem Diagramm dargestellt und dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Kontrollen: Abb. 8-28, S. 190; Mfp-3: Abb. 8-29, s. 191, DP: Abb. 8-30, S. 192). Zur Veranschaulichung wird in diesem Kapitel in Abb. 3-30 eine Kurve für jedes Protein und die Kontrollen gezeigt. Die Messung lässt sich wie bereits erläutert in drei Schritte unterteilen: Äquilibrierung des Sensors mit PBS (1), Äquilibrierung des Sensors mit 5 % HAc bei den Muschelfußproteinen (1\*), Proteinapplikation (2) und finaler Waschschrift mit PBS (3). Zunächst sollen die Kontrollen betrachtet werden. In Abb. 3-30 A ist das Dissipationsverhalten der Negativkontrolle BSA (orange) gezeigt. Durch die Proteinapplikation (Schritt 2) kommt es zu einer deutlichen Veränderung der Frequenz während sich die Dissipation über den gesamten Messzeitraum kaum verändert. Folglich handelt es sich bei BSA um eine feste Proteinschicht. Im Gegensatz dazu zeigte die Positivkontrolle MAP-Trix™ (grau) in Abb. 3-30 B die Ausbildung einer viskoelastischen Proteinschicht. Im Verlauf der Messung wurde eine Dissipation von insgesamt ca. 50 Hz gemessen. Nach dem finalen Waschschrift mit PBS (Schritt 3) konnte ein finales  $\Delta D$  von 20 Hz bestimmt werden.

Im Folgenden werden die adhäsiven Einzelblöcke (grüne Kurven) Mefp-3 und Mgf-3 betrachtet. Wie eingangs erwähnt, lagen aufgrund der Löslichkeit Mefp-3 in 5 % HAc und Mgf-3 in 25 % HAc vor. In Abb. 3-30 C sind die Frequenzverläufe von nicht-modifiziertem (hellgrün) und modifiziertem (dunkelgrün) Mefp-3 gezeigt. Die Dissipationsänderung ist vergleichbar mit der von MAP-Trix™. Außerdem ist sie unabhängig vom Hydroxylierungsgrad von Mefp-3. Somit handelt es sich bei Mefp-3 und mod. Mefp-3 um viskoelastische Proteinschichten. Nach dem finalen Waschschrift mit PBS erreicht das  $\Delta D$  nahezu den Ausgangswert. Im Vergleich dazu konnte bei Mgf-3 in Abb. 3-30 D in drei unabhängigen Messungen ein Unterschied im Dissipationsverhalten zwischen nicht-modifiziertem (hellgrün) und modifiziertem (dunkelgrün) Mgf-3 nachgewiesen werden. Aufgrund des Aufarbeitungsprozesses und dem Löslichkeitsverhalten lag Mgf-3 in 25 % HAc vor. Im Allgemeinen war von einer Wechselwirkung zwischen Essigsäure und der SiO<sub>2</sub>-Oberfläche (OF) auszugehen. Die QCM-Messungen konnten diese Vermutung bestätigen. Während der Proteinapplikation führte die Verringerung des pH-Werts unter den isoelektrischen Punkt, ( $pI_{SiO_2} = 3$  [Givens et al., 2017]), durch HAc zu einer vollständigen Protonierung aller Si-OH-Gruppen. Folglich ist die Massenzunahme plausibel, da die zusätzlichen Protonen eine Masse besitzen (aus Si-O wird Si-OH). Bei genauerer Betrachtung ist jedoch zu beachten, dass durch die QCM-Messung nicht nur die Oberfläche selbst, sondern auch angelagerte Moleküle und Ionen erfasst werden. Vor Zugabe von HAc ist die SiO<sub>2</sub>-OF negativ geladen. In der PBS-Lösung liegen diese negativen Ladungen jedoch nicht frei vor, sondern es bildet sich eine Art Stern-Schicht aus, sodass die negativen Ladungen durch K<sup>+</sup> und Na<sup>+</sup> ausgeglichen werden. Beide Kationen sind sehr viel schwerer als H<sup>+</sup>, sodass beim Ansäuern eher ein Masseverlust zu erwarten wäre. Darüber hinaus haben die negativ geladenen Si-O Gruppen ein größeres Dipolmoment als die ungeladenen Si-OH Gruppen nach der Protonierung, wodurch weniger Wassermoleküle bei der Schwingung "mitgerissen werden". Auch das würde eine Verringerung der Masse beim Ansäuern bedeuten. Sehr wahrscheinlich adsorbiert HAc selbst an die SiO<sub>2</sub>-OF und reduziert somit die Frequenz durch die höhere Masse. Dabei sind starke Van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen der polaren HAc und den ebenfalls polaren Si-OH-Gruppen zu erwarten. Darüber hinaus kann Essigsäure sehr gut Wasserstoffbrücken ausbilden und damit an die Oberfläche binden.

Um diesen Effekt von HAc auf den SiO<sub>2</sub>-Sensor weiterführend zu untersuchen, wurden 5 % und 25 % HAc als Probe während einer QCM-Messung eingesetzt. Die Analysen zeigten, dass die Essigsäurekonzentration keinen Einfluss auf die finale Frequenzänderung hat (s. Anhang,

Kap. 8.2, Abb. 8-27, S. 190). Nach dem finalen Waschschrift mit PBS lagen die Werte nahe null ( $f_{5\% \text{HAc}} = 1,3 \text{ Hz}$ ;  $f_{25\% \text{HAc}} = 4,22 \text{ Hz}$ ). Aus diesem Grund hat die höhere Essigsäurekonzentration (25 % HAc) in der Probe mit Mgf-3 keinen Einfluss auf die finale Frequenzänderung. Dennoch beeinflusst eine höhere Konzentration die Frequenzänderung während der Proteinapplikation (Schritt 2) durch Adsorption von HAc an die  $\text{SiO}_2\text{-OF}$ . Die Begründung liegt vermutlich in der Änderung des pH-Wertes [Kosmulski, 2016; Parks, 1965].  $\text{SiO}_2\text{-OF}$  sind wie bereits erläutert sehr anfällig gegenüber pH-Änderungen, die in diesem Fall durch HAc hervorgerufen werden. Insgesamt führte die höhere Essigsäurekonzentration in der Mgf-3-Probe zu einer stärkeren Frequenz- als auch Dissipationsänderung während der Proteinapplikation (Schritt 2) im Vergleich zu den Ergebnissen von Mefp-3 (gelöst in 5 % HAc) in Abb. 3-30 C. Zusätzlich zeigten die Hydroxylgruppen (DOPA) in mod. Mgf-3 einen stärkeren Effekt auf das Dissipationsverhalten als in mod. Mefp-3 (Abb. 3-30 C). Im Vergleich zu Mgf-3 war das  $\Delta D$  von mod. Mgf-3 während der Proteinapplikation um 50 Hz größer. Nach dem Waschschrift mit PBS (Schritt 3) gab es im finalen  $\Delta D$  (ca. 4 – 10 Hz) kaum Unterschiede zwischen allen Mgf-3-Proteinen.

Zum Vergleich wurde das Dissipationsverhalten der Designer-Proteine DP1A-Variate und DP2 untersucht. In Abb. 3-30 E sind die Ergebnisse der nicht-modifizierten (hellblau) und modifizierten (dunkelblau) DP1A-Variante dargestellt. In beiden Proteinvarianten kommt es zur Ausbildung einer viskoelastischen Proteinschicht. Interessanterweise führte die Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA in der DP1A-Variante zu einer Verringerung der Dissipation. Neben dem Mefp-3-Anteil besteht die DP1A-Variate aus ELP-Sequenzen als kohäsive Einheit (Kap. 3.1, s. 51). Die Modifikation im Protein scheint die intermolekularen Wechselwirkungen unter den getesteten Bedingungen so zu verändern, dass die Proteinschicht starrer im Vergleich zur nicht-mod. Variante wird. Das finale  $\Delta D$  unterscheidet sich um 100 Hz (nicht-modifizierte DP1A-Variante:  $\sim 200 \text{ Hz}$ , modifizierte DP1A-Variante:  $\sim 100 \text{ Hz}$ ). Im Gegensatz dazu konnte für DP2 das gegenteilige Verhalten beobachtet werden. In Abb. 3-30 F sind die Ergebnisse von nicht-modifiziertem (hellblau) und modifiziertem (dunkelblau) DP2 gezeigt. Bei nicht-mod. DP2 kommt es zur Ausbildung einer festen Proteinschicht und die Dissipation ändert sich über den gesamten Messzeitraum kaum. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von mod. DP2 zu einer starken Änderung in der Dissipation bis zu ca. 75 Hz. Nach dem finalen Waschschrift mit PBS (Schritt 3) wurde jedoch nahezu der Ausgangswert erreicht. Das Dissipationsverhalten von mod. DP2 ist wahrscheinlich auf die Hydroxylierungen im Tropoelastin (TE)-Teil (enthält 15 Tyr in Sequenz) zurückzuführen. Durch die zusätzlichen OH-Gruppen scheinen die inter- und intramolekularen Wechselwirkungen in DP2 so beeinflusst zu werden, dass die Proteinschicht weicher und flexibler ist und es sich folglich um eine eher viskoelastische Schicht handelt. Das in der nicht-mod. Proteinvariante starre Proteingerüst wird durch die Modifikation gelockert und ermöglicht den Einbau von Wassermolekülen, wodurch möglicherweise eine Art Hydrogel entsteht und somit das Dissipationsverhalten von mod. DP2 erklären könnte.

Insgesamt konnte durch die Betrachtung des Dissipationsverhaltens der Designer-Proteine ein zusätzlicher Aspekt zur Charakterisierung der viskoelastischen Eigenschaften betrachtet werden. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Messungen sind dem Anhang zu entnehmen (Kap. 8.2, Kontrollen: Abb. 8-28, S. 190; Mfp-3: Abb. 8-29, s. 191, DP: Abb. 8-30, S. 192). In Tabelle 3-15 (S. 109) sind die Resultate zum Dissipationsverhalten zusammengefasst.

**Tabelle 3-15 Zusammenfassung zum Dissipationsverhalten aus den QCM-Messungen der Designer-Proteine und deren mod. Proteinvarianten (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mittels mikrobieller Tyrosinase). Parameter der Proteinapplikation: Konzentration = 0,1 mg/mL im jeweiligen Puffer (Tabelle 2-22, S. 49) mit Ausnahme von BSA = 1 mg/mL, Flussrate = 60  $\mu$ L/min, T = 25 °C, t = 10 min.**

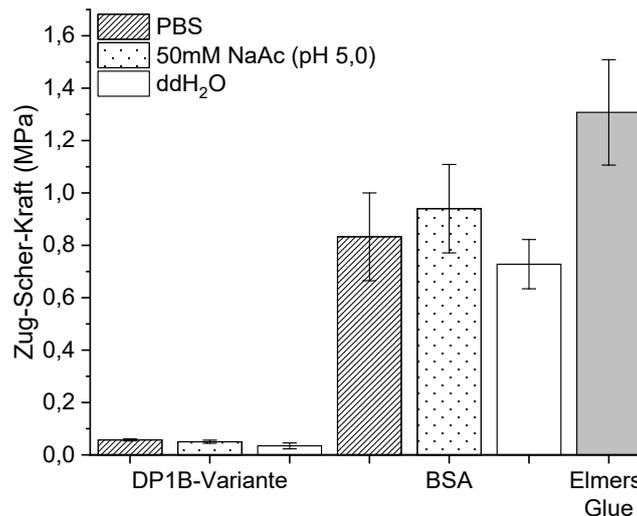
Feste Proteinschichten	Viskoelastische Proteinschichten
BSA	MAPTriX™
DP2	Mefp-3, mod. Mefp-3
	Mgfp-3, mod. Mgfp-3
	DP1A-Variante, mod. DP1A-Variante
	mod. DP2

### 3.3.3 Untersuchungen zu den Klebeeigenschaften der Designer-Proteine im Zug-Scher-Versuch

In der Literatur sind Zug-Scher-Versuche zur Testung der Funktionalität eines proteinogenen Bindemittels vielfach beschrieben [Brennan et al., 2017; Cha et al., 2009; Choi et al., 2012; Gim et al., 2008; Smith und Callow, 2006]. Jedoch sind die verschiedenen Parameter hinsichtlich Feststoffanteil und Lösungsmittel in der Klebefuge sowie die Konditionierung der Prüfkörper (Dauer, Temperatur, Feuchtigkeit, Kraft) sehr divers (Tabelle 4-4, S. 143). Aus diesem Grund und zur besseren Vergleichbarkeit der Designer-Proteine (DP) untereinander wurde in den Experimenten die methodische Prüfvorschrift der DIN EN 1465 [DIN, 2009] sowie der EN ISO 291 [CEN, 2008] als Grundlage genutzt. Die Zug-Scher-Kräfte wurden darauf basierend nach der in Kap. 2.2.7.2 (S. 50) beschriebenen Messmethodik bestimmt.

Zunächst erfolgten Vorversuche zur Testung des geeigneten Lösungsmittels. Untersucht wurde die Zug-Scher-Kraft von BSA (Kontrolle) und der DP1B-Variante in ddH<sub>2</sub>O, PBS und 50 mM NaAc (pH 5.0). Die dargestellten Daten repräsentieren den arithmetischen Mittelwert mit der Standardabweichung (SD) als Fehlerbalken (Abb. 3-31). Insgesamt wurden fünf Prüfkörper vorbereitet. An dieser Stelle ist es notwendig zu erläutern, dass nicht für jeden Prüfkörper ein verlässlicher Messwert erhoben werden konnte. Bei einer deutlich inhomogenen Verteilung des Proteinklebers, Probenaustritt aus der Klebefuge oder Bruch bzw. Verformung des Fügeteils (Micaplatte/Aluminiumplatte) wurde der Messwert nicht in die Auswertung einbezogen. Insgesamt wurden jedoch mindestens drei ( $n \geq 3$ ) Messdaten pro Protein und Bedingung verwendet. Die Standardabweichung betrug durchschnittlich 5 – 30 %.

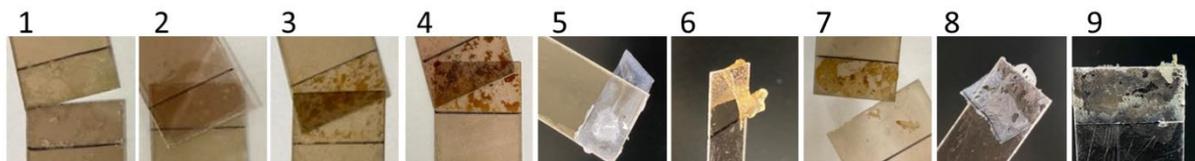
Bei dem Vergleich der Lösungsmittel war für die DP1B-Variante kaum ein Unterschied in den ermittelten Zug-Scher-Kräften zwischen ddH<sub>2</sub>O (weiß), PBS (schraffiert) und NaAc (gepunktet) zu erkennen. Für BSA (Negativkontrolle) gelöst in 50 mM NaAc wurde die höchste Kraft ( $0,87 \pm 0,19$  MPa) bestimmt. Elmers Glue als Positivkontrolle (grau) zeigte unter den getesteten Bedingungen eine Zug-Scher-Kraft von  $1,29 \pm 0,17$  MPa. In Vorversuchen wurde für die applizierte Menge Elmers Glue (50  $\mu$ L) pro Prüfkörper eine Trockenmasse von ca. 38 % bestimmt (Kap. 8.2, Tabelle 8-10, S. 192). In der Literatur sind je nach Substratoberfläche und Prüfbedingungen im Mittel folgende Kräfte für Elmers Glue angegeben:  $\sim 3$  MPa an Aluminium,  $\sim 4,3$  MPa an Stahl und 0,3 MPa an Teflon [Jenkins et al., 2017; Meredith et al., 2014; Schmidt et al., 2019].



**Abb. 3-31 Einfluss des Lösungsmittels auf die Zug-Scher-Eigenschaften an einer SiO<sub>2</sub>-OF**

Zug-Scher-Versuch zum Vergleich der Lösungsmittel: PBS (schraffiert), 50 mM NaAc; pH 5,0 (gepunktet) und ddH<sub>2</sub>O (weiß). Als Positivkontrolle diente Elmers Glue (grau), Auftragung 50  $\mu$ L (Trockenmasse  $20 \pm 0,5$  mg). Es wurden Micaplatten (25 x 75 mm, Science Services GmbH) mit einer Klebefläche von 12,5 mm x 25 mm verwendet, OF - Oberfläche.  $20 \pm 0,5$  mg Proteinpulver wurde mit 40  $\mu$ L Lösungsmittel auf dem Füge teil homogenisiert. Anschließend wurde das zweite Füge teil aufgebracht und die Prüfkörper nach der Methodik in Kap. 2.2.7.2 (S. 50) konditioniert und am Prüfgerät „Proline Z020“ gemessen. Einspannlänge 40 mm, Prüfgeschwindigkeit 2 mm/s,  $n \geq 3$ .

Darüber hinaus erfolgte eine Bruchbildbeurteilung. Neben der Zug-Scher-Festigkeit liefert der Verlauf des Bruches wichtige Informationen zur Verklebung. Dabei unterscheidet man u.a. zwischen einem Bruch in der Klebstoffmasse (Kohäsionsbruch) und Bruch zwischen Klebstoff und Füge teil (Adhäsionsbruch) [Heine, 2003]. Bei einem Adhäsionsbruch verläuft der Bruch an der Haftungsoberfläche zwischen Bindemittel und Füge teil. Dadurch wird der Klebstoff hauptsächlich von den Substratoberflächen getrennt. Bei einem Kohäsionsbruch im Kleber sind alle Füge teiloberflächen nach dem Bruch noch mit Klebstoff bzw. Klebstoffresten bedeckt. Bei der Bruchbildbeurteilung zeigte sich, dass es bei der DP1B-Variante (8) und Elmers Glue (2) zum Adhäsionsbruch und bei BSA (1) zum Kohäsionsbruch kam (Abb. 3-32).



**Abb. 3-32 Bruchbilder nach den Zug-Scher-Versuchen an SiO<sub>2</sub>-Oberflächen**

Neben der Zug-Scher-Festigkeit liefert der Verlauf des Bruches wichtige Informationen zur Verklebung der Prüfkörper (Mica-Oberfläche). Dabei unterscheidet man im Allgemeinen zwischen einem Bruch in der Klebstoffmasse (Kohäsionsbruch) und Bruch zwischen Klebstoff und Füge teil (Adhäsionsbruch). Dargestellt sind die Bruchbilder der folgenden Proben: 1 – BSA, 2 – Elmers Glue, 3 – Mefp-3, 4 – mod. Mefp-3, 5 – DP1A-Variante, 6 – mod. DP1A-Variante, 7 – Blend aus mod. Mefp-3 und mod. DP1A-Variante im Verhältnis 1:2, 8 – DP1B-Variante, 9 – TE.

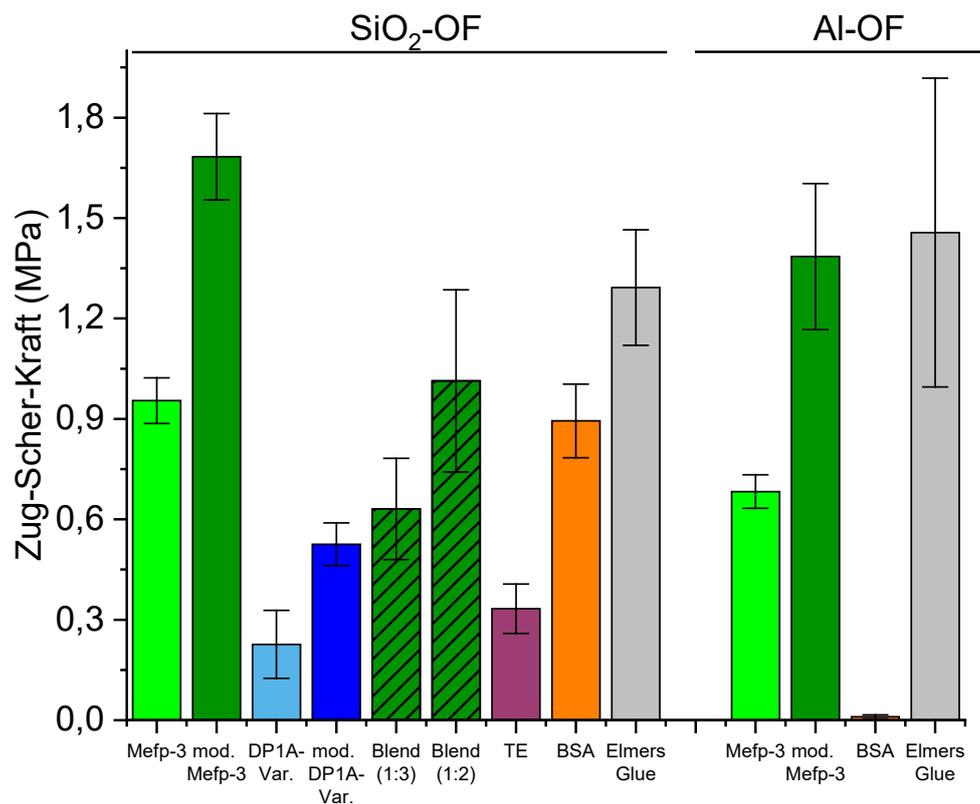
Für die Zug-Scher-Versuche der DP wurde 50 mM NaAc (pH 5,0) als Lösungsmittel ausgewählt. Zwar zeigten die getesteten Lösungsmittel im Vorversuch für die DP1B-Variante keine Unterschiede, aber dennoch ist von einer besseren Adhäsion im sauren Milieu basierend auf dem natürlichen Adhäsionsverhalten der Muschelproteine (Kap. 1.4.1.1.2, S. 15) auszugehen. Dies betrifft insbesondere die modifizierten Proteinvarianten, die DOPA enthalten. Zur Kontrolle wurden drei Proben BSA und zwei Proben Elmers Glue mitgeführt. Diese Daten wurden

gemeinsam mit den Ergebnissen des Vorversuchs evaluiert und damit die Probenanzahl erhöht. Die Beschaffenheit der Proteinlyophilisate unterschied sich je nach Sequenz und Modifikation. Deshalb wurde der Applikationsschritt für modifiziertes Mefp-3 wie folgt angepasst. Der Proteinpuder (bräunlich) wurde während des Inkubierens bei RT wie ein Harz. Das Material wurde auf das erste Fügeteil aufgebracht und mit 20  $\mu\text{L}$  Puffer homogenisiert. Dabei bildeten sich kleine Klümpchen, die sich nicht vollständig in Puffer resolubilisieren ließen. Aus diesem Grund wurde das Material so homogen, wie möglich verteilt und das zweite Fügeteil aufgebracht. Dabei zeigte sich, dass durch den Druck dennoch eine Klebefuge zwischen den Fügeteilen entstand. Unabhängig vom Volumen des Lösungsmittels blieb jedoch der Feststoffanteil für alle Proteine gleich. Da für Klebstoffe im allgemeinen die Menge des Feststoffs in der Klebefuge angegeben wird [DIN, 2009], war durch diese Anpassung kein Einfluss auf das Zug-Scher-Verhalten zu erwarten. Die Applikation der weiteren Proteine erfolgte nach dem in Kap. 2.2.7.2 (S. 50) beschriebenen Protokoll. DP2 sowie mod. DP2 waren aufgrund der Lyophilisat-eigenschaften (harzig) und der sehr hohen Klebrigkeit schlecht handhabbar und konnten für die Untersuchungen der Klebeeigenschaften nicht verwendet werden. Unter den, im Rahmen der praktischen Versuche der vorliegenden Arbeit, getesteten Bedingungen konnte keine applizierbare Proteinlösung hergestellt werden, die auf die Fügeteile aufgebracht werden konnte.

Die Ergebnisse der gemittelten Zug-Scher-Kräfte aller getesteten Proteine (Mefp-3, DP1A-Variante, TE) sind in einem Säulendiagramm (Abb. 3-33, S. 112) dargestellt. Zunächst wurden die Adhäsionseigenschaften an einer Mica-Oberfläche ( $\text{SiO}_2\text{-OF}$ ) bestimmt. Für den adhäsiven Einzelblock Mefp-3 (hellgrün) wurden  $0,95 \pm 0,07$  MPa ermittelt. Bei der Bruchbildbeurteilung zeigte sich, dass es sich um einen Kohäsionsbruch (3) handelt (Abb. 3-32, S. 110). Damit lagen die Ergebnisse für Mefp-3 im Bereich der Protein-basierten Kontrolle mit BSA (orange,  $0,87 \pm 0,19$  MPa). Die Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA zeigte einen positiven Effekt auf die Zug-Scher-Kraft und für mod. Mefp-3 (dunkelgrün) konnten  $1,68 \pm 0,13$  MPa bestimmt werden (Kohäsionsbruch (4), Abb. 3-32, S. 110). Dies ist die größte Zug-Scher-Kraft aller gemessenen Proben in der vorliegenden Arbeit. Folglich zeigte mod. Mefp-3 auch eine bessere Klebkraft als die Positivkontrolle Elmers Glue (grau,  $1,29 \pm 0,17$  MPa). Vergleichend wurde als kohäsiver Einzelblock rekombinant hergestelltes Tropoelastin (TE, freundlich bereitgestellt von M. Mende) verwendet. Unter den getesteten Bedingungen wurde für TE (violett) eine Zug-Scher-Kraft von  $0,33 \pm 0,07$  MPa ermittelt. Erwartungsgemäß zeigte sich ein Adhäsionsbruch (9) an den Fügeteilen (Abb. 3-32, S. 110). Für die DP1A-Variante (hellblau) wurde die geringste Zug-Scher-Kraft von  $0,23 \pm 0,10$  MPa bestimmt. Damit liegen die Ergebnisse im Wertebereich von TE. Wie bereits im Vorversuch für die DP1B-Variante gezeigt, kam es auch bei der DP1A-Variante zum typischen Adhäsionsbruch (5) mit einem Proteinfilm zwischen den beiden Fügeteilen (Abb. 3-32, S. 110). Die Adhäsion dieser Proteinvariante ist nicht ausreichend, um unter den getesteten Bedingungen gut an der  $\text{SiO}_2\text{-OF}$  zu haften. Auch durch Hydroxylierung konnte die Zug-Scher-Kraft nur um  $\sim 0,3$  MPa (dunkelblau,  $0,54 \pm 0,06$  MPa) erhöht werden und es war ein Proteinfilm (6) nach der Prüfung zwischen den Fügeteilen sichtbar (Abb. 3-32, S. 110). Diese Ergebnisse lassen sich durch den geringen Sequenzanteil des Mefp-3 erklären. Durch die während der Aufarbeitung auftretende Fragmentierung enthält DP1A insgesamt nur noch vier Tyr in der Peptidsequenz (Abb. 3-16, S. 79). Aus diesem Grund ist der Gesamtanteil an adhäsiven Sequenzen sehr gering und die kohäsiven Wechselwirkungen werden begünstigt.

Basierend auf diesen Resultaten wurde ein weiterer Ansatz getestet, bei dem ein Proteingemisch („Blend“) im Verhältnis 1:4 aus mod. Mefp-3 (5 mg) und mod. DP1A-Variante (15 mg)

sowie im Verhältnis 1:2 appliziert wurde. Durch die Mischung zeigte sich ein additiver Effekt. Im Verhältnis 1:4 (dunkelgrün gestreift) konnten die Adhäsionseigenschaften der mod. DP1A-Variante um  $\sim 0,1$  MPa verbessert werden ( $0,63 \pm 0,15$  MPa). Darüber hinaus wurde im Verhältnis von 1:2 (dunkelgrün gestreift) eine Zug-Scher-Kraft von  $1,01 \pm 0,27$  MPa ermittelt. Die Erhöhung des adhäsiven Anteils (mod. Mefp-3) zur DP1A-Variante im „Blend“ zeigte folglich einen positiven Effekt auf die Bindeeigenschaften an die  $\text{SiO}_2$ -OF. Basierend auf der Definition zur Bruchbildbeurteilung handelt es sich bei dem Proteingemisch um einen Kohäsionsbruch (7), da beide Fügeiteile mit Klebstoffresten benetzt waren (Abb. 3-32, S. 110). Im Vergleich zu DP1A-Variante und mod. DP1A-Variante, kam es durch den Zusatz von mod. Mefp-3 nicht zur Ausbildung eines Proteinfilms.



**Abb. 3-33 Zug-Scher-Eigenschaften der Designer-Proteine an  $\text{SiO}_2$ - und Al-OF**

Vergleichende Untersuchungen der Zug-Scher-Kräfte adhäsiver Einzelblöcke (grün), TE als kohäsiver Einzelblock (violett) sowie von DP aus einer Kombination adhäsiver und kohäsiver Protein-Blöcke (blau). Die jeweilige modifizierte Proteinvariante (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase) ist gekennzeichnet und im entsprechenden dunkleren Farbton gezeigt. Zusätzlich wurde ein Proteingemisch („Blend“) im Verhältnis 1:3 sowie 1:2 aus mod. Mefp-3 und mod. DP1A-Variante getestet (dunkelgrün, gestreift). BSA (orange) diente als Protein-basierte Kontrolle und Elmers Glue (grau) als Positivkontrolle. Es wurden Micaplatten (25 x 75 mm, Science Services GmbH) als auch Aluminiumplatten (Al, Gemmel-Metalle) mit einer Klebefläche von 12,5 mm x 25 mm verwendet, OF - Oberfläche.  $20 \pm 0,5$  mg Proteinpulver wurde mit 40  $\mu\text{L}$  50 mM NaAc (pH 5,0) auf dem Fügeiteil homogenisiert. Anschließend wurde das zweite Fügeiteil aufgebracht und die Prüfkörper nach der Methodik in Kap. 2.2.7.2 (S. 50) konditioniert und am Prüfgerät „Proline Z020“ gemessen. Einspannlänge 40 mm, Prüfgeschwindigkeit 2 mm/s,  $n \geq 3$ .

Zur besseren Vergleichbarkeit mit der Literatur wurden Mefp-3 und mod. Mefp-3 sowie BSA und Elmers Glue genutzt, um Fügeiteile aus Aluminium (Al-OF) zu verkleben. Der Prozess und die jeweilige Applikation entsprachen den Versuchen mit Micaplatten ( $\text{SiO}_2$ -OF). Die Zug-Scher-Kräfte von Mefp-3 ( $0,68 \pm 0,05$  MPa), mod. Mefp-3 ( $1,39 \pm 0,22$  MPa) und Elmers Glue

( $1,46 \pm 0,46$  Pa) lagen im Bereich der Werte gemessen an SiO<sub>2</sub>-OF (Abb. 3-33, S. 112). Die Bruchbinder sind dem Anhang zu entnehmen (Abb. 8-31, S. 193). Einen signifikanten Unterschied zwischen den getesteten Oberflächen zeigte BSA. Auf der Al-OF wurde nach Konditionierung keine Klebefuge ausgebildet und es war keine Zug-Scher-Kraft messbar. Auch in der Literatur wurden mit Al-OF kaum messbare Zug-Scher-Kräfte ( $\sim 0,07$  MPa) für BSA bestimmt [Brennan et al., 2017; Yang et al., 2013]. Bislang wurde BSA in der Literatur als kein natürliches Adhäsiv (Vergleichsprotein) verwendet, um Füge­teile aus Gold, Aluminium oder Titan zu verkleben und mit den Daten von adhäsiven Proteinen (z.B. Mfp, PC1, CP19) zu vergleichen. An diesen OF zeigte BSA kaum adhäsive Eigenschaften im Zug-Scher-Versuch und eignete sich gut als Negativkontrolle. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch Mica als Zieloberfläche für die Bindung Mfp-3-basierter DP festgelegt. An dieser OF agierte BSA als guter Kleber ( $0,87 \pm 0,19$  MPa) und bestätigte, dass sich Proteine anhand ihrer makromolekularen Eigenschaften im Allgemeinen gut als Klebstoff eignen. Mit dem Wechsel zur Al-OF zeigte sich deutlich der Unterschied zu Mefp-3, welches aufgrund seiner spezifischen Seitenketten eine gute Klebkraft an diesen OF aufweist.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung und die rekombinante Produktion eines Protein-basierten Bindemittels für die Verwendung an  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen. Dafür wurden nach intensiver Literaturrecherche adhäsive und kohäsive Proteinsequenzen ausgewählt und für die Entwicklung bester Bindungseigenschaften systematisch in einer Sequenzbibliothek kombiniert. Als adhäsiver Anteil wurden Muschelfußproteine ausgewählt, deren Sequenz Tyrosine zur späteren Modifikation zu DOPA enthält (Kriterium I). Als kohäsiver Protein-Block sollten Elastin-ähnliche-Sequenzen in die artifiziellen Proteine eingebaut werden (Kriterium II). Für das Design der neuartigen Bindeproteine wurde das Muschelfußprotein-3 (Mfp-3) ausgewählt. Neben der Variante aus *M. galloprovincialis* (Mgfp-3), welche bereits von anderen Wissenschaftlern rekombinant gewonnen wurde [Hwang et al., 2005; Yang et al., 2013], war auch Mfp-3 aus *M. edulis* (Mefp-3) Teil der Sequenzbibliothek. Die Mfp-3 weisen eine Ähnlichkeit von 58,3 % auf und unterscheiden sich nur geringfügig (Abb. 1-9, S. 15). Während in Mefp-3 ein zusätzliches Tyrosin an Position 22 vorkommt, enthält Mgfp-3 im Gegensatz dazu N-terminal zwei Tyrosine. Diese Tyrosine können durch Reaktion mit Tyrosinase zu DOPA hydroxyliert werden. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass sowohl die Position als auch die benachbarten Aminosäuren zu DOPA eine essentielle Rolle in der Bindung Mfp-basierter Sequenzen spielen und die Adhäsion beeinflusst werden kann [Degen et al., 2021; Li et al., 2020; Li et al., 2017]. Aufgrund der Sequenz-basierten Unterschiede in Mefp-3 und Mgfp-3, wurden in der vorliegenden Arbeit beide Varianten in den Designer-Proteinen (DP) untersucht.

Im Anschluss an das Protein-Design wurde die rekombinante Produktion der DP sowohl im Schüttelkolben- als auch im Bioreaktormaßstab (15 L) in verschiedenen *E. coli*-Stämmen verglichen. Dieser Aspekt stellte eine besondere Herausforderung der vorliegenden Arbeit dar, da es sich bei DP um künstliche, nicht-natürlich vorkommende Proteine handelt. In der Literatur vergleichbarer Proteine erfolgte die Produktion lediglich im Schüttelkolbenmaßstab oder in  $\leq 5$  L Bioreaktormaßstab (Tabelle 4-1, S. 122). Nach erfolgreicher Etablierung, Anpassung und Optimierung der Kultivierungsbedingungen folgte die Isolierung nach Auswahl geeigneter Reinigungsmethoden aus *E. coli*. Die Untersuchungen zur rekombinanten Produktion der DP und deren Ausbeuten werden in Kap.4.1 (S. 115) diskutiert.

Für die anwendungsorientierte Funktionalisierung der DP wurde eine post-translationale Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) durchgeführt. Alternativ zu der oft in der Literatur eingesetzten Pilz-Tyrosinase wurde in der vorgelegten Arbeit eine mikrobielle Tyrosinase ( $\text{His}_6\text{-mTyr}$ ) verwendet. Die Untersuchungen zur rekombinanten Produktion sowie zur Aktivität der  $\text{His}_6\text{-mTyr}$  werden in Kap. 4.2 (S. 123) diskutiert. In diesem Zusammenhang stellten der quantitative Nachweis der Hydroxylierung, sowie die Lokalisation der Modifikation in der Polypeptidkette der DP eine weitere Aufgabenstellung dar.

Final erfolgten die funktionelle Charakterisierung, sowie die mechanische Testung der DP an  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen. Dabei war der Vergleich zwischen adhäsiven Einzelblöcken und den kombinierten DP, bestehend aus adhäsiven und kohäsiven Blöcken, interessant. Des Weiteren wurde der Einfluss der post-translationalen Modifikation von Tyr zu DOPA in den DP auf struktureller als auch auf funktionaler Ebene untersucht. In Kap. 4.3 (S. 131) werden die Ergebnisse unter Beachtung der vorhandenen Literatur diskutiert.

## 4.1 Rekombinante Produktion von Mfp-3 und ELP-basierten Proteinen

Zu Beginn der praktischen Arbeiten wurden für das Protein-Design, basierend auf dem Prinzip eines guten Klebstoffs (Abb. 1-2, S. 3), adhäsive und kohäsive Protein-Blöcke ausgewählt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Muschelfußprotein-3 (Mfp-3) als zentraler Block für die Proteinadhäsion an  $\text{SiO}_2$ -Oberflächen festgelegt. Die Begründung zur Auswahl dieses Protein-Blocks basierend auf den Literaturangaben ist in Kap. 1.4.1 (S. 11) erläutert. Daraus entwickelte sich die Mfp-3-basierte Fusionsbibliothek (Kap. 3.1, S. 51) deren Sequenzen in Tabelle 3-1 und Abb. 3-1 (S. 51) vorgestellt wurden. Basierend auf den besonderen Materialeigenschaften und einer vergleichbar einfachen und schnellen Reinigungsmethode aus *E. coli* wurden Elastin-ähnliche Sequenzen als kohäsive Blöcke für die Designer-Proteine verwendet (Kap. 1.4.2, S. 18). Die Basis für das Protein-Design von DP1A/B war die ELP-Sequenz (VPGVG) aus der Arbeit von [Desai et al., 2016]. Die Forscher untersuchten den Zusammenhang zwischen der Anzahl an Pentapeptid-*repeats* in den ELP (höheres MW) und der sequenzspezifischen Übergangstemperatur ( $T_t$ ), bei der sich das Polypeptid von einer unstrukturierten Anordnung (*random-coil*) zu geordneten intra- und intermolekularen  $\beta$ -Helix-Strukturen ( $\beta$ -*spiral*, mit einem Typ II  $\beta$ -*turn* pro Pentamer) faltet (Abb. 1-12, S. 20) [Girotti et al., 2004]. Desai und Kollegen zeigten, dass sich  $T_t$  mit einer höheren Anzahl an Pentapeptid-*repeats* (VPGVG)<sub>n</sub> verringert:  $n = 50$ ,  $T_t = 40^\circ\text{C}$  >  $n = 75$ ,  $T_t = 34^\circ\text{C}$  >  $n = 100$ ,  $T_t = 31^\circ\text{C}$ . Unter Abwägung der gewünschten  $T_t$  zur Reinigung von DP1A/B mittels ITC wurde der ELP-Block mit 75 Wiederholungen eingebaut (Kap. 3.1.1.2, S. 52). Neben einem ELP-Block in DP1A/B, wurde Tropoelastin (TE) aufgrund der ähnlichen Eigenschaften als kohäsive Einheit in DP2 verwendet (Tabelle 3-1, S. 51).

### 4.1.1 Rekombinante Produktion von Mfp-3-Proteinen

Die biotechnologische Gewinnung von Mfp ist in den vergangenen 20 Jahren Gegenstand intensiver Forschung gewesen. Die Mfp wurden bislang mittels His<sub>6</sub>-*tag* über eine Affinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Eine Übersicht ist in Tabelle 4-1 (S. 122) dargestellt. In der vorgelegten Arbeit wurde für die rekombinante Produktion der Mfp-3 Einzeldomänen ein neuer Ansatz gewählt und die Proteine wurden als His<sub>6</sub>-SUMO-Fusionsproteine designt (Kap. 3.1.1.1, S. 52). Durch die Fusion mit dem eukaryotischen Protein SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) kann die Löslichkeit sowie die Produktion rekombinanter Proteine erhöht werden [Marblestone et al., 2006]. In der vorliegenden Arbeit konnte die Löslichkeit auch für die Mfp-3 erhöht werden. Die Zielproteine wurden in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS produziert (Kap. 3.2.2.1, S. 59) und mittels IMAC gereinigt (Kap. 3.2.2.2, S. 61). Aus den Aufarbeitungen aus dem löslichen Zellextrakt konnten im Durchschnitt 2 mg/g<sub>BFM</sub> His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (~ 249 mg/L<sub>Kultur</sub>) und 4,2 mg/g<sub>BFM</sub> His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 (~ 457 mg/L<sub>Kultur</sub>) gewonnen werden. Es konnte erstmalig eine erfolgreiche rekombinante Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 sowie die Gewinnung von Mefp-3 nach der enzymatischen Abspaltung von His<sub>6</sub>-SUMO mittels der SUMO-Protease (ScUlp1) gezeigt werden (Kap. 3.2.2.2.2, S. 62). Nach Verdau mittels ScUlp1 lagen beide Zielproteine vollständig als Präzipitat vor. Um die Zielproteine in Lösung zu bekommen, waren saure Bedingungen erforderlich (z.B. 25 % HAC). Der SUMO-*tag* in His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 und His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 trägt somit maßgeblich zur Löslichkeit der Mfp-3 bei. Nach Abspaltung des His<sub>6</sub>-SUMO-Proteins lag die Ausbeute für Mefp-3 bei ~ 55 mg/L<sub>Kultur</sub> und für Mgfp-3 bei ~ 100 mg/L<sub>Kultur</sub>.

In der Literatur ist eine rekombinante Gewinnung für Mefp-3 aus *M. edulis* bislang nicht beschrieben. Für die Sequenzvariante aus *M. galloprovincialis* (Mgfp-3) wurde eine Ausbeute von 2,5 mg/L<sub>Kultur</sub> im 3 L Bioreaktormaßstab erhalten [Hwang et al., 2005]. Die Produktion eines Fusionsproteins aus Mgfp-3 und Mgfp-5 in *E. coli* in einem 10 L Bioreaktormaßstab lieferte eine Verbesserung der Proteinausbeute. Nach der Reinigung aus *Inclusion bodies* konnten Gim und Kollegen 39 mg/L fp-353 gewinnen [Gim et al., 2008]. Die bislang höchste Ausbeute mit 47 mg/L<sub>Kultur</sub> Mgfp-3 wurde durch eine Codon-usage Optimierung des Gens für Mgfp-3 für *E. coli* und das Entfernen der nativen Signalsequenz erzielt [Yang et al., 2013]. In der vorliegenden Arbeit konnte die Ausbeute der Mgfp-3-Variante im Vergleich zu Yang und Kollegen durch die Verwendung des SUMO-Systems auf ~ 100 mg/L<sub>Kultur</sub> verdoppelt werden (Tabelle 4-1, S. 122). Darüber hinaus konnten die Proteine erstmalig löslich in *E. coli* im 9 L-Bioreaktormaßstab produziert werden und ein reproduzierbares Protokoll zur Gewinnung der Mfp-3 wurde entwickelt.

#### 4.1.2 Rekombinante Produktion Elastin-basierter Sequenzen

In der vorliegenden Arbeit konnten mittels dem angepassten Protokoll für das *Inverse transition cycling* (ITC, Kap. 2.2.5.2, S. 42) insgesamt 71 mg/L<sub>Kultur</sub> DP1A-Variante, 69 mg/L<sub>Kultur</sub> DP1B-Variante und 36 mg/L<sub>Kultur</sub> DP2 produziert werden (Tabelle 4-1, S. 122). Damit liegen die Ausbeuten im Bereich der Literaturangaben ELP-basierter Proteine, die mittels ITC gewonnen wurden: ~ 30 mg/L<sub>Kultur</sub> [Haider et al., 2005; Nagarsekar et al., 2002], 40 – 70 mg/L<sub>Kultur</sub> [Meyer und Chilkoti, 1999], 16 – 87 mg/L<sub>Kultur</sub> [Christensen et al., 2009], 85 mg/L<sub>Kultur</sub> [Xia et al., 2011]. Seit den 1990er Jahren wurden bereits viele Aspekte der heterologen Produktion von ELP-basierten Sequenzen untersucht. Meyer und Kollegen haben verschieden große ELP-Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* produziert [Meyer und Chilkoti, 1999]. Die Ausbeute an Fusionsprotein nahm mit zunehmender ELP-Länge für (VPGVG)<sub>n</sub> ab (70 mg/L bei n = 30 bzw. 40 mg/L bei n = 180). Die ELP-Länge scheint jedoch keinen Einfluss auf die Effizienz der Reinigung zu haben und alle Fusionskonstrukte konnten vollständig aus den Zellysaten gewonnen werden („...recovery from cell lysate was complete for all fusion constructs.“). Christensen und Kollegen untersuchten den Einfluss der Position von ELP im Fusionsprotein auf das Expressionslevel in *E. coli* BLR (DE3), sowie die Ausbeuten an gereinigtem Protein [Christensen et al., 2009]. Die Positionierung von ELP am C-Terminus des Zielproteins (Protein-ELP) führte zu einer höheren Expression der vier untersuchten ELP-Fusionsproteine und folglich zu einer höheren Zielproteinausbeute. Insgesamt wurden Ausbeuten von ~ 16 – 87 mg/L<sub>Kultur</sub> erzielt. Eine Ausnahme stellen die Ergebnisse von Chow und Kollegen dar [Chow et al., 2006]. Durch Medienoptimierung konnte eine enorme Steigerung der Produktivität mit einer Ausbeute von 1,6 g/L<sub>Kultur</sub> GFP-ELP in *E. coli* erreicht werden. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte jedoch, dass es sich um ein Proteingemisch handelt. Neben der Zielproteinbande bei 65,5 kDa war ebenfalls eine Bande bei 55 kDa sichtbar. Die Forscher vermuteten, dass es sich um eine Verunreinigung handelt, die unspezifisch an das GFP-ELP binden kann. Diese Proteinbande wurde nicht weiter analysiert. Aus diesem Grund ist auch in dieser Studie eine Fragmentierung des Zielproteins, basierend auf den veröffentlichten Daten, nicht auszuschließen.

In der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass die Proteinbiosynthese hoch-repetitiver Zielproteine wie z.B. Spinnenseideproteine in *E. coli* durch die Bereitstellung der notwendigen t-RNAs limitiert ist und die Translation vorzeitig abgebrochen werden kann. Dies kann jedoch mit Hilfe von *metabolic engineering* optimiert werden [Xia et al., 2010]. In einer weiteren Studie wurde der metabolische Bedarf, der mit der rekombinanten Proteinproduktion basierend auf

Glucose und Glycerin einhergehen, mit drei unterschiedlichen Computer-gestützten Methoden ermittelt [Kaleta et al., 2013]. Daraus wurden die Aminosäuren (AS) Met, Phe und Leu identifiziert, die die Biosynthesemaschinerie von *E. coli* am stärksten belasten. Darüber hinaus zeigte die Analyse, dass der Polymerisationsbedarf von Proteinen im Fall von Glycerin als C-Quelle, fast vollständig durch die Energie, die bei der AS-Biosynthese entsteht, kompensiert werden konnte. Demzufolge ist Glycerin nach Beginn der rekombinanten Proteinproduktion als C-Quelle oft besser geeignet als Glucose. Beispielsweise wurde in der Studie von Luo und Kollegen die Biosynthese von TRAIL (engl. *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) in *E. coli* um Faktor 1,59 unter Verwendung von Glycerin als C-Quelle (3,16 g/L<sub>Kultur</sub>) im Vergleich zu Glucose (1,99 g/L<sub>Kultur</sub>) nach Induktion erhöht [Luo et al., 2006].

In Bezug auf ELP-Sequenzen konnte dieser Zusammenhang auch in der bereits erwähnten Studie von Chow und Kollegen gezeigt werden. Durch Zugabe von Glycerin und bestimmter AS zum Komplexmedium wurde die Proteinproduktion und folglich die Ausbeute einer Fusion aus GFP-ELP optimiert [Chow et al., 2006]. Entgegen der Erwartung zeigten auch AS wie z.B. Asn, Asp, Gln und Glu, die nicht in ELP-Sequenzen vorkommen, einen positiven Effekt auf die Proteinausbeute. Die Forscher stellten die Hypothese auf, dass die überproportionalen Mengen dieser AS in ELP und ELP-Fusionsproteinen eine viel höhere Anforderung an Stoffwechselwege und deren Metabolit-Zwischenprodukte stellen, als zelluläre *E. coli* Proteine und möglicherweise zu einer Erschöpfung der intrazellulären Aminosäurepools führen. *E. coli* ist in der Lage, alle für die Proteinsynthese erforderlichen 20 AS aus Ammoniumsalzen zu synthetisieren. Die Biosynthese von AS wird stark durch Endproduktregulierung und Aminosäuretransporter kontrolliert [Bailey und Ollis, 2018]. Eine mögliche Methode zur Wiederauffüllung der intrazellulären Aminosäurepools ist demzufolge die Zugabe von AS zum Medium. Daher würde die Ergänzung bestimmter AS, die dem glykolytischen Stoffwechselweg nachgelagert sind, für die rekombinante Proteinsynthese von Vorteil sein. Insgesamt konnte mit dem optimierten Medium die Ausbeute von GFP-ELP im Schüttelkolben um das 36-fache auf 1,6 g/L<sub>Kultur</sub> gesteigert werden [Chow et al., 2006]. Anhand dieser Daten wurde ein interessanter Aspekt in der rekombinanten Produktion ELP-basierter-, aber auch anderer repetitiver Polypeptide, gezeigt. Aus diesem Grund wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Zugabe verschiedener AS (Gly, Pro, Asn, Asp, Gln, Glu) während der Kultivierung von *E. coli* BW3110 zur Produktion von DP1A getestet. Jedoch zeigte dieser Ansatz keine Verbesserung in der Ausbeute des Zielproteins (Daten nicht gezeigt). Die Ursache liegt vermutlich in der Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme. In der Literatur wurde *E. coli* BLR (DE3) verwendet. In diesem Stamm tritt häufig eine basale Genexpression auf, die bereits in der exponentiellen Wachstumsphase durch die Synthese eines rekombinanten Proteins, das Wachstum stark reduziert und folglich die Gesamtproteinausbeute reduziert [Hartnett et al., 2006]. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die rekombinante Produktion von DP1A/B in *E. coli* BW3110. Durch das zu Grunde liegende positiv regulierte Promotorsystem, wurde eine Basalexpression ohne Induktor (Rhamnose) vermieden. Aus diesem Grund war die metabolische Last dieser *E. coli* Zellen geringer und der intrazelluläre Aminosäurepool war zu Beginn der Induktion noch nicht ausgeschöpft, weshalb die Zugabe von AS zum Medium vermutlich keine Verbesserung in der Proteinausbeute zeigte. Insgesamt konnte aber der positive Effekt von Glycerin im Medium auf die rekombinante Produktion ELP-haltiger Proteine bestätigt werden. In der vorgelegten Arbeit wurde unter Verwendung von TB-Medium (enthält 0,5 % (m/v) Glycerin) im Vergleich zu LB- oder MM-Medium eine höhere Proteinexpression (Beurteilung der Bandenintensitäten) von DP1A/B in *E. coli* BW3110 erzielt (Kap. 3.2.3.1.1, S. 68).

### 4.1.3 Up-Scaling und Abbau der DP1-Proteine

Im Zuge des *Up-Scaling* zur Reinigung ausreichender Mengen an DP1A/B, kam es zur Fragmentierung der Zielproteine innerhalb der Mfp-3-Sequenzen. Der Abbau war unabhängig von der gewählten Reinigungsmethode. Sowohl nach der chromatografischen Reinigung mittels IMAC (Kap. 3.2.3.2.1.2, S. 72) als auch mittels *Inverse transition cycling* (ITC) (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74), lagen DP1A/B verkürzt vor. In der Literatur ist zur rekombinanten Produktion von Mfp-3 und Mfp-3-Fusionsproteinen kein Abbau beschrieben [Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005; Wang und Scheibel, 2018a; Yang et al., 2013]. Der einzige Unterschied zu den Literaturangaben lag in den ausgewählten Produktionsorganismen. Mfp-3 und Mfp-3-basierte Sequenzen wurden in *E. coli* BL21 Stämmen produziert und in der vorliegenden Arbeit wurde *E. coli* BW3110 für die Synthese von DP1A/B ausgewählt (Tabelle 4-1, S. 122). Aus dem Vergleich der Organismen ergab sich folgender Unterschied: in *E. coli* BL21 sind die Schlüsselproteasen OmpT und Lon deletiert. Das Fehlen dieser Proteasen soll den Abbau heterologer Proteine verringern [Studier und Moffatt, 1986]. Während die Lon-Protease aufgrund ihres Abbauverhaltens nicht infrage kommt [Kuroda et al., 2001; Lee und Suzuki, 2008], ergab eine Recherche in Hinblick auf die Substratspezifität, dass die Membran-gebundene Protease OmpT eine Spezifität für das -RvR- Sequenzmotiv (Abb. 3-16) zeigt [McCarter et al., 2004]. Basierend auf diesen Erkenntnissen erfolgte ein Stammwechsel und DP1A wurde in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS produziert (Kap. 8.2, Abb. 8-15, S. 180). Jedoch konnte der Wechsel des Produktionsstammes die Fragmentierung des Zielproteins nicht verhindern und die OmpT Protease konnte als Ursache des Abbaus ausgeschlossen werden (Kap. 8.2, Abb. 8-16, S. 181).

Da für die Testung der Bindeeigenschaften die intakten Designer-Proteine mit der Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Sequenzblöcken getestet werden sollten, erfolgten weitere zahlreiche Experimente, um dem Abbau entgegenzuwirken. Weder durch den Einsatz verschiedener Protease-Inhibitoren (PMSF [Brungardt et al., 2020], cComplete™ Protease Inhibitor Cocktail von Roche [Nallamsetty und Waugh, 2007], Protease Inhibitor Mix III von Genaxxon [Genaxxon, 2015], 1 M KCl [Ayyash et al., 2013]), noch der Einsatz denaturierender Agenzien (Harnstoff und Guanidiniumchlorid) [Haneskog, 2006] während Zellaufschluss und IMAC konnten der Fragmentierung entgegenwirken. Lediglich 1 M KCl im Resuspensionspuffer erwies sich zur teilweisen Inhibierung von Proteaseaktivität im kleinen Maßstab (Reinigung aus ~ 5 g BFM) als wirksam. Dieses Ergebnis deutete auf eine proteolytische Aktivität hin. Darüber hinaus erfolgten Untersuchungen zur Hitzefällung und Aceton-Extraktion als alternative Aufarbeitungsmethoden zur Vermeidung des Abbaus. Jedoch führten diese Experimente auch nicht zur Gewinnung von vollständigem DP1A/B. Trotz der verschiedenen Ansätze konnte die Fragmentierung im Verlauf der Proteinaufarbeitung nicht unterbunden werden. Auch der Wechsel zur alternativen Reinigungsmethode mittels ITC konnte keine Lösung der Abbauproblematik liefern. Bei der Maßstabsvergrößerung kam es ebenfalls zur Fragmentierung von DP1A/B. Es erfolgten auch für das ITC diverse Experimente, um dieses Problem zu vermeiden. Allerdings waren anhand der Resultate weder Scherkräfte bei dem mechanischen Zellaufschluss, noch das Milieu (pH-Wert) oder die Temperatur während des ITC-Verfahrens für den Abbau verantwortlich.

Aus den Ergebnissen zur heterologen Produktion im Schüttelkolben- und Bioreaktormaßstab von DP1A/B in *E. coli* BW3110 war nicht von einem vorzeitigen Translationsabbruch während der Proteinsynthese auszugehen. Die 1/OD<sub>600</sub>-Proben zeigten weder im Verlauf der Kultivierung als auch zum Zeitpunkt der Ernte Abbaufragmente oder schwächere Signale auf Höhe der Zielproteine in der Western-Blot-Analyse (Kap. 3.2.3.1.2, Abb. 3-12 B & D, S. 69). Um eine

vorzeitige Faltung des ELP-Blocks durch temperaturinduzierte intra- und intermolekulare Wechselwirkungen zu vermeiden, erfolgte die Synthese der Zielproteine stets durch die Zugabe des Induktors (5 mM Rhamnose) nach Reduktion der Kultivierungstemperatur auf 25 °C. Die dominanten DP1-Fragmente zeigten sich erst nach Reinigung mittels IMAC oder ITC und waren im WB nachweisbar (Kap. 3.2.3.2.1.2, Abb. 3-14 C, S. 73). Ebenfalls wurde die *E. coli* BW3110 Biofeuchtmasse (Lagerung bei - 20 °C) überprüft, um potenzielle Lagerungseinflüsse auszuschließen. Es wurde zum einen eine SDS-PAGE-Probe intakter Zellen angelegt als auch ein Zellaufschluss im kleinen Maßstab zur Analyse des Rohextraktes (RE) durchgeführt. Beide Proben zeigten in der WB-Analyse keine Abbaufragmente (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnte ein Lagerungseffekt ausgeschlossen werden.

Aus den Ergebnissen zur Reinigung der DP1-Proteine geht hervor, dass die Verweildauer im RE einen Einfluss auf die Stabilität von DP1A/B hat. Der Zeitraum von Zellaufschluss bis zur Beladung der Ni(II)-Sephacel-Säule oder dem Beginn des ITC-Verfahrens nimmt im größeren Maßstab deutlich zu (wenige Minuten bis mehrere Stunden). Es ist daher davon auszugehen, dass die DP1-Proteine einem möglichen Abbau durch Proteasen unterlagen. Allerdings war dieses Ergebnis unerwartet. Zum einen wurde beim Protein-Design auf die Vermeidung von Schnittstellen intrazellulärer Proteasen (für die vorliegende Arbeit in *E. coli*) geachtet und zum anderen wurde ein Protease-Inhibitor-Cocktail (cOmplete™, EDTA-frei, Roche) verwendet und bis zur Reinigung (Auftragung auf die IMAC / 1. Zyklus ITC) auf Eis gearbeitet. Darüber hinaus wurde zur Vermeidung einer langen Verweildauer von DP1 im RE zur Nutzung einer gepackten Chromatographiesäule alternativ die Durchführung einer *Batch*-Adsorption untersucht. Die Durchführung der *Batch*-Adsorption erfolgte nach einem Protokoll von Dr. Martin Wolfram [Wolfram, 2018]. Auch dieses Experiment führte nicht zur Gewinnung von intaktem DP1. Bereits vor Adsorption an die Ni(II)-Sephacel™ excel beads (GE Healthcare) konnten in der WB-Analyse Fragmente unterschiedlichen Molekulargewichts (~ 20, 22, 34 kDa) nachgewiesen werden. In den Elutionsfraktionen wurden lediglich Spuren auf der zu erwartenden Höhe des Zielproteins detektiert (Daten nicht gezeigt).

Es konnte allerdings eine Spezies einer DP1-Variante mit einer Molekularen Masse von ca. 35 kDa mittels ITC reproduzierbar aus *E. coli* BW3110 gewonnen werden. Die Bestimmung der Proteintermini dieser DP1A-Variante erfolgte N-terminal mittels Edman-Sequenzierung (Kap. 3.2.3.2.2, Tabelle 3-5, S. 78) und C-terminal mittels ISD/T3-Sequenzierung (Kap. 11, Abb. 11-6 und Tabelle 11-2, S. 212). Interessanterweise lagen die Schnittstellen zwischen zwei basischen Aminosäuren. Nach erneuter Literaturrecherche konnten zwei potenzielle Proteasen als Ursache identifiziert werden. Die Protease II (ptrB) [Kanatani et al., 1991] ist eine endogene Serin-Protease, die nach Lys- und Arg-Resten (P1) innerhalb der Polypeptidkette schneiden kann und somit das Muster erklärbar wäre. Als Protease-Inhibitor für die ptrB ist 1 mM Diisopropylfluorophosphat (DFP) oder 1 mM Tosyl-L-lysinchloromethylketon (TLCK) in der Literatur beschrieben [Pacaud und Richaud, 1975; Tsuru und Yoshimoto, 1994]. Beispielfähig wurde in der vorliegenden Arbeit 1 mM DFP im Prozess eingesetzt. Doch die Zugabe von DFP im Lysepuffer und während der Reinigung von DP1A (Kap. 8.2, Abb. 8-14, S. 180) konnte den Abbau nicht verhindern.

Interessanterweise war für die Mefp-3-Einzeldomäne trotz gleicher Aminosäuresequenz und somit gleicher potenzieller Schnittstelle kein Abbau nachweisbar. Die MALDI-MS-Analysen zeigten für Mefp-3 (Kap. 3.2.2.3.2, Abb. 3-11, S. 67) intakte Massen. Auch DP2, welches C-terminal Mefp-3 als adhäsiven Block enthält, wurde nicht in dem Maße fragmentiert. Basierend auf dem Protein-Design der DP (Kap. 3.1, S. 51) besteht der einzige Unterschied im

eingebauten kohäsiven ELP-Block in den DP1. Eine Vermutung wäre, dass im Fall der DP1-Proteine, der ELP-Teil zu einer Art strukturellen Streckung der Mfp-3-Sequenzen kommt, welche die Polypeptidkette im Vergleich zu den His-SUMO-Fusionen der Einzeldomänen von Mfp-3 anfälliger für Proteolyse macht. Mutmaßungen dieser Art müssten in Folgeexperimenten evaluiert werden. Insgesamt konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit weder eine Lösung dieser Fragmentierungsproblematik noch deren Ursache gefunden werden.

Die Problematik der Fragmentierung rekombinanter Proteine bei der Produktion in *E. coli* ist bekannt [Baneyx und Georgiou, 1991; Meerman und Georgiou, 1994; Rozkov und Enfors, 2004] (Kap. 1.5, S. 22). In der Literatur wird häufig beschrieben, dass co-translational auftretende Faltungsfehler zu Translationsabbrüchen oder Proteolyse führen kann [Baneyx und Mujacic, 2004; Joseph et al., 2015; Singha et al., 2017]. Auch rekombinant hergestellte künstliche Proteine in *inclusion bodies* (IB) können fehlgefaltet und nach Solubilisierung nicht in die gewünschte Struktur zurückfaltbar sein [Sutherland et al., 2018]. Aus diesem Grund wurden diese Aspekte sowohl bei dem Protein-Design, der Wahl des Produktionsstammes, der Kultivierungsbedingungen, als auch während der Proteinreinigung berücksichtigt (Kap. 1.3, S. 9). Darüber hinaus wurde der Produktionsprozess an Literaturdaten angelehnt, wie es strategisch bereits für die einzelnen Protein-Blöcke gezeigt wurde. Da aus der Aufarbeitung der DP1A/B-Varianten eine spezifische Schnittstelle zwischen zwei basischen AS präsent zu sein scheint, kann ein proteolytischer Abbau durch die gängigen Proteasekomplexe in *E. coli* wie der caseinolytischen Proteasen (ClpAP, ClpCP, ClpXP oder ClpYQ) [Gottesman et al., 1997; Tyedmers et al., 2010] ausgeschlossen werden, die diese Sequenz nicht erkennen und spalten können. Für künftige Experimente wäre eine Änderung der Schnittstellen in den Mfp-3-Sequenzteilen von Interesse, um einen sequenzspezifischen Abbau zu bestätigen, aber auch entgegenwirken zu können.

Im Allgemeinen sind auch Herausforderungen bei der Maßstabsvergrößerung zur Gewinnung größerer Mengen an gereinigten rekombinanten Proteinen bekannt und sind in der Literatur beschrieben [Krausch et al., 2020; Tripathi, 2009; Wurm, 2016]. In Bezug auf *up-stream* Verfahren werden bei der Maßstabsvergrößerung von mikrobiellen *Fed-Batch*-Fermentationen traditionell technische Kriterien wie Reaktionsgeschwindigkeit, Energiezufuhr, Durchmischung und Stoffaustausch zugrunde gelegt [Enfors und Häggström, 1994]. Diese Methoden berücksichtigen jedoch nicht die Reaktion von Mikroorganismen auf ihre Umgebung im größeren Maßstab. In den vergangenen Jahrzehnten wurde jedoch immer deutlicher, wie wichtig es ist, den biologischen Teil des Systems zu berücksichtigen. Insbesondere bei Fermentationen rekombinanter Proteine waren die Ergebnisse des Prozess-*Scale-ups* in vielen Fällen nicht vorhersehbar [Riesenberg et al., 1990]. Die Schwierigkeit beim *Scale-up* von biotechnischen Prozessen besteht darin, dass ein großer Reaktor durch die Begrenzung des Energieeintrags und der Durchmischung nicht so homogen ist, wie ein Schüttelkolben (SK) oder ein Reaktor mit geringem Gesamtvolumen. Dies führt zu einer Begrenzung des Stofftransports und zu einem Gradienten im Reaktor, insbesondere für das Energiesubstrat, die Gasverteilung und den pH-Wert. Diese Parameter beeinflussen die Produktion rekombinanter Proteine maßgeblich und führen häufig zu einer schlechteren Ausbeute des Zielproteins im Vergleich zur Produktion im kleinen Maßstab. Aus diesem Grund müssen für eine optimierte Verfahrensentwicklung häufig mehrere Versuche durchgeführt, parameterbezogen und mit einem optimierten Prozessmodell ausgewertet werden. Diese zielführende Methodik ist jedoch aus Zeit- und Materialgründen nicht in jedem Fall umsetzbar.

Darüber hinaus können auch beim *Scale-up* im *Downstream* Prozess Probleme auftreten, da oft die Dauer des Verfahrens deutlich zunimmt. Das betrifft parallel die Dauer der Zellabtrennung, des Zellaufschlusses (intrazelluläres Zielprotein) und der Produktreinigung (chromatografisch oder nicht-chromatografisch) [Prokopakis und Asenjo, 2020]. Dies kann sowohl die Proteinstabilität als auch die spezifische Aktivität im Falle von Enzymen beeinflussen, und somit einen Effekt auf die Ausbeute und die Qualität rekombinanter Zielproteine zeigen. Die Prozessdauer scheint auch in der vorliegenden Arbeit für die Reinigung der DP1 ein entscheidender Faktor gewesen zu sein. Für die Aufarbeitung im kleinen Maßstab aus  $\sim 1,5$  g BFM konnten zunächst sowohl mittels IMAC (Abb. 3-13, S. 71) als auch mittels ITC (Abb. 3-15 A, S. 76) intakte DP1 gewonnen werden. Die Fragmentierung trat erst mit Maßstabsvergrößerung auf. Bei dem Vergleich der Proteinausbeuten mit relevanten Literaturangaben ist daher der Produktionsmaßstab interessant. Die höchste Ausbeute von  $1,6 \text{ g/L}_{\text{Kultur}}$  wurde für die Produktion von GFP-ELP erhalten [Chow et al., 2006]. Der Prozess erfolgte aber lediglich im 50 mL-Schüttelkolbenmaßstab. Die Ausbeuten der DP1-Proteine in der vorliegenden Arbeit ergaben sich aus der Reinigung aus *E. coli* Zellen, die im 15 L-Bioreaktormaßstab kultiviert wurden. Dieser Zusammenhang ist bei dem Vergleich mit den Literaturdaten in Tabelle 4-1 (S. 122) zu berücksichtigen.

Zusammenfassend konnte anhand der Edman-Sequenzierung und der ISD/T3-Analyse bestätigt werden, dass die verkürzten DP1-Varianten (Abb. 3-16, S. 79) Mfp-3-Sequenzanteile mit Tyr-Resten enthalten, die für die Modifikation zu DOPA zur Verfügung standen. Somit war ein wichtiges Kriterium an das Design der DP erfüllt. Zudem war aus der Literatur bekannt, dass auch kurze Muschelfußsequenzen gute adhäsive Eigenschaften zeigen können [Li et al., 2017; Numata und Baker, 2014; Yamamoto et al., 2000; Yu und Deming, 1998]. Demnach blieb die Grundidee zum Design eines Protein-basierten Bindemittels bestehen (Kap. 1.3.1, S. 9), welches adhäsive und kohäsive Sequenzanteile enthält. Auch die weitere Verwendung sowie die funktionelle Charakterisierung der verkürzten DP1-Varianten liegen darin begründet.

Tabelle 4-1 Übersichtstabelle zur rekombinanten Produktion Mfp- und ELP-basierter Proteine

Protein- block	MW (kDa)	Produktions- stamm	Kultivierungsbedingungen						Lokali- sation	Ausbeute (g/L <sub>Kultur</sub> )	Literatur
			Vol. (L)	Med.	Maßst.	rpm	T (°C)	Ind.			
Mgfp-3A	7,0	<i>E. coli</i> BL21	3,00	LB	BR	250	37	1 mM IPTG, 12 h	Peripl., lösl.	0,003	[Hwang et al., 2005]
Mgfp-5	18,1	<i>E. coli</i> BL21	3,00	LB	BR	250	37	1 mM IPTG	Intraz., lösl.	0,003	[Hwang et al., 2004]
Mcfp-3	36,1	<i>K. lactis</i>	0,20	LB + Gal	SK	N/A	30	n.a.	Extraz., lösl.	0,001	[Platko et al., 2008]
Mgfp-3A	6,7	<i>E. coli</i> BL21	5,00	LB	BR	250	37	1 mM IPTG, 5 h	Intraz., lösl.	0,047	[Yang et al., 2013]
fp-353	25,1	<i>E. coli</i> BL21	3,00	LB	BR	250	37	1 mM IPTG, 12 h	Intraz., IB	0,039	[Gim et al., 2008]
ELP (VAG) <sub>40</sub>	9,1	<i>P. pastoris</i> GS115	1,38	MM + Glycerin	BR	N/A	30	MeOH	Extraz., lösl.	0,760	[Schipperus et al., 2012]
ELP	31,4	<i>E. coli</i> BLR	0,06	TB	SK	300	37	ohne IPTG, „üN“	Intraz., lösl.	n.d.	[Desai et al., 2016]
GFP-ELP	65,5	<i>E. coli</i> BLR	0,05	TB +AS	SK	300	37	1 mM IPTG, 4 h	Intraz., lösl.	1,600	[Chow et al., 2006]
RLP-ELP -CLP	11,5	<i>E. coli</i> BL21	1,00	LB	SK	N/A	37	0,1 mM IPTG, 3 h	Intraz., lösl.	0,050	[Bracalello et al., 2011]
TE (IF4)	64,0	<i>E. coli</i> BL21	0,10	LB	SK	N/A	37	0,1 mM IPTG, 3 h	Intraz., lösl.	0,045	[Vrhovski et al., 1997]
His <sub>6</sub> -SUMO- Mefp-3	19,2	<i>E. coli</i> BL21 pLysS	9,00	TB	BR	400*	37	25 °C, 100 g/h <i>feed</i> , 1 mM IPTG, 17 h	Intraz., lösl.	0,250	vorliegende Arbeit (Kultivierung Kap. 2.2.3.1.2, S. 37)
His <sub>6</sub> -SUMO- Mgfp-3	19	<i>E. coli</i> BL21 pLysS	9,40	TB	BR	400*	37	25 °C, 100 g/h <i>feed</i> , 1 mM IPTG, 17 h	Intraz., lösl.	0,460	
DP1A- Variante	34,8	<i>E. coli</i> BW3110	15,00	TB	BR	400*	37	25 °C, 100 g/h <i>feed</i> , 5 mM Rhamnose, 17 h	Intraz., lösl.	0,071	
DP1B- Variante	34,6	<i>E. coli</i> BW3110	15,00	TB	BR	400*	37	25 °C, 100 g/h <i>feed</i> , 5 mM Rhamnose, 17 h	Intraz., lösl.	0,069	
DP2	67,3	<i>E. coli</i> BL21 pLysS	15,00	TB	BR	400*	37	25 °C, 100 g/h <i>feed</i> , 1 mM IPTG, 2 h	Intraz., lösl.	0,036	

Mgfp - Muschelfußproteine aus *Mytilus galloprovincialis*, Mcfp-3 – Muschelfußprotein-3 aus *Mytilus californianus*, ELP – Elastin-ähnliche Polypeptide, SLP – Seiden-ähnliche Polypeptide, RLP – Resilin-ähnliche Polypeptide, CLP – Kollagen-ähnliche Polypeptide, S – Seiden-Block, C – Kollagen-Block, TE(IF4) – Tropoelastin, Isoform 4, MW – Molekulargewicht, IB – *inclusion bodies*, MM – Minimalmedium, MMLBM – Modifiziertes M9 Minimalmedium, AS – Aminosäuren, SK – Schüttelkolben, BR – Bioreaktor, Gal – Galaktose, *feed*-Lösung – 150 g/L Hefeextrakt und 250 mL/L Glycerin (Kap. 2.2.3.1.2, S. 37), \* – Anpassung der Drehzahl während der Fermentation um pO<sub>2</sub> ≥ 30 % zu gewährleisten.

## 4.2 Post-translationale Modifikation von Tyrosinen

In der Literatur wird die post-translationale Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA als Grundlage der natürlichen Adhäsion beschrieben (Kap. 1.4.1.1.2, S. 15). In Muschelfußproteinen (Mfp), isoliert aus verschiedenen Spezies, wurde mittels MALDI-TOF-MS ein Gemisch unterschiedlichen Hydroxyierungsgrades nachgewiesen [Papov et al., 1995; Waite und Andersen, 1978a; Waite, 1983b; Waite, 1985]. Die Forscher postulierten, dass je nach Umgebung (Temperatur, pH-Wert, Oberfläche, Salzgehalt im Wasser) und Alter der Muschel die Modifikation der Mfp zur Anhaftung an die Zieloberfläche angepasst wird. Um diese natürlichen Hydroxyierungsmuster der Muschelfußproteine zu imitieren, werden in der Literatur drei Ansätze beschrieben: (I) *in vitro* Modifikation mittels Tyrosinasen, (II) *in vivo* Modifikation durch Produktion in einem Tyr-auxotrophen Organismus und (III) co-translationale Modifikation (*in vivo*) durch Co-Expression einer Tyrosinase. In der vorliegenden Arbeit wurden die Ansätze (I) und (II) zur Modifikation der Mfp-3 untersucht. Im Folgenden werden diese drei Ansätze vorgestellt und deren Vor- und Nachteile diskutiert. Es gibt verschiedene Methoden zum Nachweis eingefügter Hydroxylierungen. Dazu zählen die NBT-Färbung als qualitativer Nachweis von DOPA [Wang und Scheibel, 2018a; Yang et al., 2014b], die Bestimmung des Gehalts an DOPA mittels massenspektrometrischer Analysen [Hwang et al., 2007; Kim et al., 2018; Yao et al., 2022] sowie die Analyse des Aminosäuregemischs nach saurer Hydrolyse mittels HPLC oder MS [Do et al., 2017]. Aussagen über die genaue Anzahl an eingefügten OH-Gruppen und zur Position der Hydroxylierungen in der Proteinsequenz wurden bislang nur in einer Studie zu einem Mfp-1 Decapeptid getroffen [Burzio und Waite, 2002]. In der Literatur für Mfp-3 oder Mfp-5 basierte Fusionsproteine wird die mögliche Ausbildung von 3,4,5-Trihydroxyphenylalanin (TOPA) durch den Einsatz von Tyrosinase nicht betrachtet. Aufgrund der Relevanz für die Klebeeigenschaften war eine exakte Bestimmung der Hydroxylierungen in den Designer-Proteinen in der vorliegenden Arbeit von großem Interesse.

### 4.2.1 *In vitro* Modifikation mittels Tyrosinasen

Bislang wurde in der Mehrzahl der Studien die *in vitro* Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA verwendet. Zu den Vorteilen gehört die gezielte Modifikation des Substrates (Proteins) unter kontrollierten Reaktionsbedingungen. Für Mfp-basierte Sequenzen wurde häufig die Pilz-Tyrosinase aus *A. bisporus* (Sigma) eingesetzt [Brennan, 2015; Cha et al., 2009; Gim et al., 2008; Hwang et al., 2005; Jiang et al., 2022; Wang und Scheibel, 2018a; Yang et al., 2013]. Nachteilig ist der relativ geringe Hydroxyierungsgrad von 15 – 40 % (Tabelle 4-2, S. 130). Die mikrobielle Tyrosinase bietet gegenüber der gängig genutzten Pilz-Tyrosinase eine vielversprechende Alternative. Der Grad an DOPA für Peptid-gebundene Tyr ist mit 53 %, 13 – 38 % höher [Axambayeva et al., 2018; Do et al., 2017; Fairhead und Thöny-Meyer, 2010; Zaidi et al., 2014]. Dabei zeigte die C-terminal verkürzte mTyr aus *V. spinosum* die bislang höchste spezifische Aktivität unter den getesteten mTyr Varianten [Fairhead und Thöny-Meyer, 2010; Yao et al., 2022].

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die mikrobielle Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) aus *V. spinosum* zur Modifikation der DP verwendet (Kap. 3.2.2.3, S. 64; Kap. 3.2.3.3, S. 80; Kap. 3.2.4.3, S. 87). Die rekombinante Produktion in *E. coli* basierte auf Literaturangaben [Axambayeva et al., 2018]. Anstelle von *E. coli* BL21 (DE3) wurde in der vorgelegten Arbeit der Produktionsstamm *E. coli* KRX verwendet (Kap. 3.2.1.2, S. 54). Dieser Stamm enthält ein unabhängig reguliertes Promotorsystem, welches die Reduktion einer basalen Genexpression ermöglicht, die häufig für *E. coli* BL21 (DE3) Stämme beschrieben wird [Hartnett et al., 2006].

Insgesamt konnten aus der Aufarbeitung 20,7 mg/g<sub>BFM</sub> ( $\hat{=}$  248 mg/L<sub>Kultur</sub>) aktive His<sub>6</sub>-mTyr gewonnen werden. Daten zur Ausbeute sind in der Arbeit von [Axambayeva et al., 2018] nicht angegeben. Aus den Angaben der Publikation lässt sich jedoch ermitteln, dass aus insgesamt 442 mg Protein im Zellysate 15,1 mg His<sub>6</sub>-mTyr gewonnen wurden. Dies entspricht  $\sim$  3,4 % His<sub>6</sub>-mTyr vom Gesamtprotein. In der hier vorgelegten Arbeit wurden 496 mg aktive His<sub>6</sub>-mTyr aus 1007 mg Gesamtprotein ( $\sim$  49 %) isoliert. Aus der Literatur ist bekannt, dass *E. coli* zur Hyperproduktion rekombinanter Proteine in der Lage ist ( $>$  50 % des Gesamtproteins) [Baneyx, 1999; Choi et al., 2006]. Diese Ausbeuten sind bislang vor allem für die rekombinante Produktion von humanem Insulin beschrieben. Das Insulin wurde in Form von *inclusion bodies* in *E. coli* angereichert und konnte durch eine einfache Reinigung und Rückfaltung gewonnen werden [Goeddel et al., 1979; Kim und Lee, 1996; Ladisch und Kohlmann, 1992]. Folglich konnte mit einfachen Veränderungen der Produktionsbedingungen (*E. coli* Stamm, Promotorsystem und Medium) in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung in der Proteinausbeute löslicher rekombinanter His<sub>6</sub>-mTyr um den Faktor 14 im Vergleich zur Literatur erreicht werden.

Anschließend war ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten der rekombinant hergestellten His<sub>6</sub>-mTyr mit der kommerziell erhältlichen Pilz-Tyrosinase (Sigma) für Tyr als Substrat von Interesse (Kap. 3.2.1.3.1, S. 55), um die Literaturdaten zu verifizieren. Unter den getesteten Reaktionsbedingungen wurde bei 25 °C eine 130-fach höhere Aktivität ( $A_{\text{spez}} = 264580 \text{ U/mg}$ ) für die His<sub>6</sub>-mTyr bestimmt und bei 37 °C wurden 351240 U/mg ermittelt (90-fach höher als die der Pilz-Tyrosinase). In der Literatur ist eine spezifische Aktivität der rekombinant produzierten His<sub>6</sub>-mTyr von 13199 U/mg ( $T = 25 \text{ °C}$ ) unter gleichen Reaktionsbedingungen angegeben [Axambayeva et al., 2018]. Demnach konnte in der vorliegenden Arbeit für His<sub>6</sub>-mTyr eine um den Faktor 20 höhere spezifische Aktivität bestimmt werden. Die Ursache für den Unterschied konnte basierend auf den Literaturangaben nicht geklärt werden. Hierbei ist zu beachten, dass es sich nicht um die klassische Einheit für die spezifische Aktivität ( $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol/min}$ ) handelt. Im „Sigma-Assay“ wird folgende Definition verwendet: eine Unit führt zu einem Anstieg bei  $A_{280}$  von 0,001 pro Minute bei 25 °C in einem 3 mL-Reaktionsgemisch mit L-Tyr ( $c_{\text{Reaktion}} = 0,34 \text{ mM}$ ) (Kap. 2.2.6.4.1, S. 45). Diese Definition diente als Grundlage zur Berechnung von  $A_{\text{spez}}$  der untersuchten Tyrosinasen.

Für die Anwendung der tyrosinhaltigen DP als Kleber ist die Modifikation zum Catechol (DOPA) relevant, um maximale Bindeeigenschaften an die Zieloberfläche zu erzielen. Tyrosinasen sind jedoch promiskuitive Enzyme, die sowohl Tyr als auch DOPA als Substrat erkennen, so dass als Produkte DOPA und TOPA (trihydroxyliert) entstehen können (Abb. 1-11, S. 17). Bislang wurde in den Studien zur Hydroxylierung Mfp-basierter Sequenzen nicht zwischen der Ausbildung von dihydroxylierten (DOPA) oder trihydroxylierten (TOPA) Proteinspezies unterschieden. Es wird lediglich ein Hydroxylierungsgrad angegeben (Tabelle 4-2, S. 130). Für ein besseres Verständnis und die Auswahl einer geeigneten Tyrosinase, ist die Betrachtung der kinetischen Eigenschaften der Enzyme gegenüber beiden Aminosäuren wichtig. Der  $K_M$ -Wert der His<sub>6</sub>-mTyr für monophenolische Substrate ist um den Faktor 30 niedriger als für Diphenole (0,26 mM L-Tyr / 7,9 mM L-DOPA) [Fairhead und Thöny-Meyer, 2010]. Somit ist die His<sub>6</sub>-mTyr Reaktion spezifischer für die gewünschte Reaktion zur Catecholbildung. Für gereinigte Pilz-Tyrosinase aus *A. bisporus* wurden hingegen folgende kinetische Konstanten in 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6,8) bei 25 °C bestimmt:  $K_M = 0,27 \text{ mM}$ ;  $k_{\text{cat}} = 7,9 \pm 0,2 \text{ s}^{-1}$  (L-Tyr) und  $K_M = 0,8 \text{ mM}$ ;  $k_{\text{cat}} = 107,4 \pm 4,4 \text{ s}^{-1}$  (L-DOPA) [Espín et al., 1998]. In einer aktuelleren Studie von Selinheimo und Kollegen wurden die kinetischen Konstanten der kommerziell erhältlichen Pilz-Tyrosinase von Sigma für Mono- und Diphenole charakterisiert und verglichen [Selinheimo et al., 2009]. Die Studie ergab folgende Parameter:  $K_M = 0,2 \text{ mM}$

(L-Tyr) und  $K_M = 0,17$  mM (L-DOPA) in 0,1 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) bei 25 °C. Die Unterschiede zur Arbeit von Espin und Kollegen können auf die Reinheit der verwendeten Tyrosinasen zurückzuführen sein, da die Tyrosinase von Sigma mehrere Isoformen enthält und somit ein Proteingemisch vorliegt [Wichers et al., 2003; Wichers et al., 1996]. Die in der Literatur zur Hydroxylierung Mfp-basierter Sequenzen verwendete Pilz-Tyrosinase aus *A. bisporus* (Sigma) [Akemi Ooka und Garrell, 2000; Hwang et al., 2005; Marumo und Waite, 1986; Wang und Scheibel, 2018b; Yu und Deming, 1998] zeigt somit ähnliche  $K_M$ -Werte für mono- und diphenolische Substrate. Für eine gezielte Hydroxylierung Peptid-gebundener Tyr zu DOPA bietet die in der vorliegenden Arbeit verwendete His<sub>6</sub>-mTyr also zwei Vorteile, zum einen eine höhere spezifische Aktivität, und zum anderen die gewünschte Spezifität für monophenolische Substrate. Darüber hinaus wurde Borat zum Reaktionsgemisch gegeben (Kap. 2.2.6.4.2, S. 46). Durch die reversible Bindung von DOPA unmittelbar nach dessen Bildung, verbessert Borat die DOPA-Ausbeute erheblich und reduziert unerwünschte Nebenreaktionen zu TOPA oder Dopachinon [Kan et al., 2014]. In einer Studie zur Modifikation von Mfp-Peptiden unter Verwendung der Pilz-Tyrosinase und Borat im Reaktionsansatz wurde kein TOPA mittels Aminosäurehydrolyse und Tandem-MS nachgewiesen [Wei et al., 2015]. Ein weiterer wichtiger Aspekt neben der Betrachtung von Tyr als Substrat, war die Reaktivität in Bezug auf Mfp-basierte Sequenzen, wie die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Designer-Proteine: DP1A/B-Variante, DP2, sowie die adhäsiven Einzelblöcke Mefp-3 und Mgf-3 (Tabelle 3-1, S. 51 und Abb. 3-1, S. 51). Bislang konnte eine Hydroxylierung Peptid-gebundener Tyr zu DOPA für keine Tyrosinase photometrisch in Echtzeit nachgewiesen werden. Auch in der vorgelegten Arbeit konnten sowohl für His<sub>6</sub>-mTyr als auch für die Pilz-Tyrosinase unter den getesteten Bedingungen keine verlässlichen Daten generiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher wird in der Literatur zur *in vitro* Modifikation Mfp-basierter Sequenzen mittels Tyrosinase in der Regel eine Reaktionszeit von 3 – 6 h angegeben [Brennan et al., 2017; Hwang et al., 2005; Yang et al., 2013]. Perspektivisch wäre eine zeitaufgelöste Analyse der Tyrosinase-Reaktion zur Untersuchung der Reaktivität gegenüber Mfp-basierter Sequenzen vom großen Interesse. Dabei könnte die Reaktion zu verschiedenen Zeiten gestoppt werden und die Hydroxylierungen im Zielprotein diskontinuierlich z.B. mittels massenspektrometrischer Analysen nachgewiesen werden.

Wie häufig in der Literatur beschrieben, wurde auch in der vorliegenden Arbeit zunächst das qualitative NBT-Verfahren zum Nachweis von DOPA (Kap. 2.2.6.4.2, S. 46) verwendet [Axambayeva et al., 2018; Choi et al., 2012; Wang und Scheibel, 2018a; Yang et al., 2014a; Yang et al., 2014c]. Dadurch konnte im Allgemeinen eine Aussage über den Erfolg der Hydroxylierung Peptid-gebundener Tyr zu DOPA in den DP getroffen werden. Zur detaillierteren Analyse sind jedoch aufwendigere Nachweisverfahren notwendig. In der Literatur wurde DOPA bisher mittels MALDI-MS [Brennan et al., 2017; Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2004; Kim et al., 2018] oder nach saurer Hydrolyse und anschließender Aminosäureanalyse mittels HPLC [Choi et al., 2015; Kim et al., 2021] quantitativ bestimmt (Tabelle 4-2, S. 130). Für synthetische Di- oder Tripeptide wurde für den Umsatz mit Pilz-Tyrosinase eine Ausbeute von 60 – 88 % erreicht [Marumo und Waite, 1986]. In einem Mfp-basierten Protein konnten lediglich 30 – 35 % DOPA nachgewiesen werden (Pilz-Tyrosinase, Sigma) [Cha et al., 2009; Hwang et al., 2007]. Trotz der Unterschiede zu den natürlichen Hydroxylierungsmustern und des zum Teil niedrigen Hydroxylierungsgrades wurde die Pilz-Tyrosinase bislang als Standardenzym zur Modifikation Mfp-basierter Sequenzen eingesetzt. Dennoch ist bei der Verwendung der kommerziellen Tyrosinase deren Reinheitsgrad zu beachten. In Studien wurden verschiedene kommerzielle Tyrosinaseprodukte untersucht und in fast allen Proben Aktivitäten von

Cellulase, Chitinase, Laccase, Mannase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Xylosidase und Xylanase neben der Tyrosinase-Aktivität gefunden [Flurkey et al., 2008; Rescigno et al., 2007]. Auch das Produkt von Sigma enthält ein nicht homogen gereinigtes Enzym und die enthaltenen Verunreinigungen können die spezifische Aktivität der Tyrosinase in den Experimenten beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wurde rekombinant produzierte His<sub>6</sub>-mTyr zur Modifikation der DP eingesetzt. Die Hydroxylierung wurde mittels MALDI-MS der intakten Proteine analysiert. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass His<sub>6</sub>-mTyr die Peptid-gebundenen Tyr in den Mfp-3-Sequenzen in verschiedenem Maß hydroxyliert (Mefp-3: Abb. 3-11, S. 67; DP1A: Abb. 3-18, S. 82; DP2: Abb. 3-22, S. 89). Dadurch entsteht für alle DP ein Gemisch hochgradig hydroxylierter Proteinvarianten. Für lösliches Mefp-3, welches zehn Tyr enthält (Abb. 3-10, S. 66), konnten beispielsweise Spezies mit einer Anzahl von 1 – 10 eingefügten OH-Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 3-11 B). Durch Verwendung der His<sub>6</sub>-mTyr für die Modifikation der DP in Anwesenheit von Borat ist davon auszugehen, dass das Enzym favorisiert Tyr anstelle von DOPA erkennt und hydroxyliert [Kan et al., 2014]. Mit der in der vorliegenden Arbeit rekombinant hergestellten His<sub>6</sub>-mTyr konnte somit erstmals ein Hydroxylierungsgrad eines Mefp-3-Proteinspezies von 100 % detektiert werden (Tabelle 4-2, S. 130). Im Vergleich mit der Literatur wurden 53 % eines Mfp-basierten Decapeptides mittels der His<sub>6</sub>-mTyr modifiziert [Do et al., 2017]. Dieses Ergebnis zeigt den Vorteil in der Nutzung mikrobieller Tyrosinasen zur Hydroxylierung Peptid-gebundener Tyr als Alternative zur klassischen Pilz-Tyrosinase von Sigma. Darüber hinaus konnte mittels MALDI-MS das Vorhandensein von 3,4,5-Trihydroxyphenylalanin (TOPA) sowohl in der Probe „mod. Mefp-3 (Pellet)“ (Abb. 3-11 C, S. 67) als auch in der DP1A-Variante (Abb. 3-18, S. 82 und Tabelle 3-7, S. 83) nachgewiesen werden. Bislang wurde TOPA nur in einem synthetisch hergestellten Decapeptid (AKPSYHypHypTYK) nach Inkubation mit einer Pilz-Tyrosinase mittels MALDI-MS detektiert [Burzio und Waite, 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurde für die His<sub>6</sub>-mTyr aus *V. spinosum* erstmalig die Reaktivität Peptid-gebundener Tyr zu TOPA nachgewiesen. Die exakte Position von TOPA in der Polypeptidkette der DP konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Dafür müssten die unterschiedlich hydroxylierten Proteinspezies zunächst chromatografisch getrennt und anschließend durch Spontan-Fragmentierung (engl. *in-source decay*, ISD) mittels MALDI-MS analysiert werden. Durch die zum Teil sehr geringen Mengen bestimmter Proteinspezies eines Hydroxylierungsgrades, waren die Resultate der Analysen bislang nicht verlässlich. Der Einfluss von TOPA auf die Bindemittleigenschaften ist bisher nicht vollständig geklärt und wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einige Studien lassen einen positiven Effekt der zusätzlichen Hydroxylgruppe in TOPA auf die Materialeigenschaften von Biopolymeren vermuten [Cui und Liu, 2021; Silverman und Roberto, 2007]. Im Gegensatz dazu werden negative Effekte auf die Bindung Mfp-enthaltener Sequenzen auf Oberflächen durch das Vorhandensein von TOPA beschrieben, da die zusätzliche OH-Gruppe die kohäsiven Kräfte verstärkt [Brennan et al., 2017; Burzio und Waite, 2002; Taylor, 2002]. Weitere Literatur suggeriert, dass ein TOPA-modifiziertes Biopolymer im Vergleich zum Catechol (DOPA) bessere Hydrogel-Eigenschaften zeigt [Lee et al., 2021]. Dies ist ein Indiz für verbesserte kohäsive Kräfte durch die zusätzliche Hydroxylgruppe. In den vorgestellten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegt mod. Mefp-3 nach der Hydroxylierungsreaktion mit His<sub>6</sub>-mTyr anteilig löslich und unlöslich (Pellet) vor. In der Probe „mod. Mefp-3 (Pellet)“ wurden Spezies mit einem höheren Grad an Hydroxylierung (>10 \* 16 Da), und somit das wahrscheinliche Vorhandensein von TOPA detektiert (Abb. 3-11 C, S. 67). Der Nachweis von TOPA kann das verstärkte Koazervationsverhalten von Mefp-3 erklären. Je mehr DOPA sowie TOPA in Mefp-3 enthalten ist, desto stärkere

intermolekulare Interaktionen sind möglich, die zur Aggregation führen. Mod. Mefp-3 aus der Pelletfraktion konnte anteilig in 50 % HAc resolubilisiert werden (Daten nicht gezeigt). Demnach wäre eine sukzessive Gewinnung der stark hydroxylierten Mefp-3 Spezies durch wiederholtes Resolubilisieren des Pellets in 50 % HAc denkbar. Des Weiteren müsste der Einfluss von TOPA auf die Adhäsion durch weitere experimentelle Untersuchungen verifiziert werden. Zunächst müssten die unterschiedlich hydroxylierten Proteinspezies in ausreichenden Mengen in einer präparativen HPLC gewonnen und materialwissenschaftlich untersucht werden. Der Einfluss der Hydroxylierungsvarianten (1 – 10 OH-Reste in Mefp-3) auf die Adhäsion ließe sich anschließend u.a. mittels QCM-D analysieren.

#### 4.2.2 *In vivo* Modifikation

Alternativ zum *in vitro* Ansatz gibt es weitere Systeme zur Produktion DOPA-enhaltener Zielsequenzen. Dazu gehören die *in vivo* Inkorporation von DOPA und die Proteinproduktion in zellfreien Systemen (CFPS, engl. *cell-free protein synthesis*) zum Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren wie DOPA. Beide Methoden werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt und bewertet. Vorteil der *in vivo* Modifikation kann der co-translationale Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren (wie DOPA) sein, wodurch der zusätzliche Schritt einer *in vitro* Modifikation des Zielproteins im Downstream-Prozess wegfällt. Zu den Nachteilen gehören der Bedarf an Tyr-armen Medien und/oder Tyr-auxotropher Wirte, reduziertes Zellwachstum durch den Einbau nicht-natürlicher AS in alle translatierten Wirtsproteine, als auch die Notwendigkeit einer entsprechenden tRNA-Synthetase für die effiziente Inkorporation von DOPA in das Zielprotein. In der Literatur wurde der co-translationale Einbau von DOPA bereits erfolgreich für rekombinantes Mgf-3 gezeigt [Kim et al., 2021; Yang et al., 2014a; Yang et al., 2016]. Während der Kultivierung wird anstelle von Tyr zugefügtes DOPA an die tRNA<sup>Tyr</sup> mittels der *E. coli* Tyrosyl-tRNA Synthetase (TyrRS) gebunden und so in Tyr-enhaltene Zielproteinsequenzen wie in Mgf-3 eingebaut. Eine zusätzliche enzymatische Hydroxylierung der Tyr zu DOPA innerhalb der Polypeptidkette nach Reinigung des Zielproteins ist demnach nicht notwendig. Die Produktion erfolgte in 0,4 L SK-Maßstab und es wurden insgesamt 3 – 5 mg/L<sub>Kultur</sub> mod. Mgf-3 gewonnen [Yang et al., 2014a]. Mittels saurer Hydrolyse konnte ein DOPA-Gehalt von 94 % in Mgf-3 nachgewiesen werden. Dies ist der höchste Hydroxylierungsgrad rekombinant hergestellter Mfp-basierter Proteinsequenzen, der bislang in der Literatur beschrieben ist und zeigt den größten Vorteil des *in vivo* Ansatzes.

In der vorliegenden Arbeit wurde der co-translationale Einbau von DOPA nach den Literaturangaben für die Produktion von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 untersucht. Jedoch waren die Ausbeuten an modifiziertem Zielprotein auch nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen so gering, dass nur Spuren im Western-Blot und NBT-Blot (qualitativer Nachweis von DOPA) nachweisbar waren (Daten nicht gezeigt). Als Begründung der geringen Proteinsynthese kann die geringere Effizienz bei dem *in vivo* Einbau nicht-natürlicher AS wie DOPA durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase genannt werden. Für die *in vivo* Inkorporation von DOPA in His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 wurde der gleiche Produktionsstamm (*E. coli* JW2581.1) und die experimentellen Bedingungen nach Literaturangaben verwendet [Yang et al., 2014a], sodass das Ergebnis unerwartet war. Die genaue Ursache der geringen Proteinsynthese wurde nicht weiterführend untersucht.

Alternativ zum *in vivo* Einbau artifizieller AS in rekombinante Proteine kann die Proteinproduktion in zellfreien Systemen (CFPS) untersucht werden. Nach Literatur kann die CFPS eine Technologie für eine effiziente Proteinproduktion so genannter "schwer zu exprimierender" Proteine sein, deren Synthese in konventionellen *in vivo* Proteinproduktionsplattformen eine

Herausforderung darstellt [Thoring et al., 2017; Whittaker, 2013]. Mit diesen Systemen können darüber hinaus die Limitierungen der *E. coli* tRNA Synthetasen beim Einbau nicht-natürlicher AS umgangen werden, indem gereinigte oder optimierte tRNA Synthetasen zum System hinzu gegeben werden. Nachteile dieser Technologie stellen jedoch eine relativ niedrige Proteinausbeute im Vergleich zu klassischen Expressionssystemen, eine kostspielige Extraktaufbereitung beim Arbeiten mit gereinigten Synthesekomponenten und in der Regel kleine Reaktionsvolumina dar [Zemella et al., 2015]. In der Literatur wurde bereits der Einbau von DOPA in einem zellfreien *E. coli*-basierten Transkriptions- und Translationssystem untersucht [Ozawa et al., 2005]. Die *E. coli* TyrRS, die für die Beladung der tRNA mit Tyr oder DOPA zur Verfügung steht, besitzt folgende  $K_M$ -Werte:  $K_M$  (DOPA) = 1,4 mM;  $K_M$  (Tyr) = 6  $\mu$ M [Calendar und Berg, 1966; Högenauer et al., 1978]. Trotz des 200-fach höheren  $K_M$ -Wertes für DOPA, konnten Ozawa und Kollegen zeigen, dass die gereinigte *E. coli* TyrRS in der Lage ist, die tRNA effizient mit DOPA *in vitro* zu beladen und DOPA in vier unterschiedliche Proteine einzubauen: Peptidyl-prolyl Isomerase (PpiB) aus *E. coli*, humanes Cyclophilin A (hCypA), *E. coli* Flavohämoglobin (HMP) und GFP aus *Aequorea victoria*.

Ergänzend zu den gezeigten Ergebnissen zur klassischen rekombinanten Produktion in der vorliegenden Arbeit wurde auch der zellfreie Ansatz für die Synthese von DP1A untersucht und erste Grundlagen für diese Methode geschaffen. Diese Versuche zeigten neben der Zielproteinbande auch Fragmente mit geringerem Molekulargewicht im Western-Blot (Abb. 8-33, S. 194). Diese Fragmente ließen zunächst auf einen Translationsabbruch schließen. Die Zugabe von zusätzlichen tRNAs und AS konnte die Fragmentierung von DP1A minimieren, aber nicht verhindern, so dass ein Translationsabbruch nicht die einzige Ursache sein konnte. Basierend auf diesen Ergebnissen war zudem von einem proteolytischen Abbau auszugehen. Zur Prüfung dieser Hypothese war ein Wechsel von einem *E. coli*-basierten zu einem eukaryotischen Zelllysate sinnvoll. Vergleichend erfolgte die Synthese im prokaryotischen System *E. coli* als auch im eukaryotischen System in Insektenzelllysaten aus *Spodoptera frugiperda* (Sf21). Diese Analysen wurden freundlicherweise von Frau Doreen Wüstenhagen am Fraunhofer IZI-BB (Abteilung Dr. Kubick) durchgeführt. Im Gegensatz zum *E. coli* System waren nach Expression im eukaryotischen Sf21-System keine Fragmente des Zielproteins nachweisbar (Abb. 8-34, S. 194). Diese Resultate unterstützen die Vermutung, dass DP1A im prokaryotischen System proteolytisch abgebaut wird. Bei der Synthese von DP1A im Sf21-System waren die Proteinausbeuten mit ca. 3  $\mu$ g/mL gering. Für die geplante Anwendung im materialwissenschaftlichen Bereich (QCM-D und Zug-Scher-Versuche) war dies nicht ausreichend. Eine Optimierung durch Anpassung der Reaktionstemperatur sowie Dauer der Synthese konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht umgesetzt werden. Um künftig höhere Proteinausbeuten zu erhalten, bietet sich zudem das „Continuous-Exchange Cell-Free“ (CECF) Verfahren an. Damit konnten bereits Proteinausbeuten eines globulären Proteins (EGFR-eYFP, MW: 160 kDa) bis zu 1 g/L erreicht werden [Thoring et al., 2017].

### 4.2.3 Co-Expression von Tyrosinasen und Mfp-Sequenzen

Ein weiterer Ansatz ist die Co-Expression einer Tyrosinase und einem Mfp-basierten Zielprotein. Der Prozessschritt der *in vitro* Modifikation zur Gewinnung DOPA-enhaltener Proteine entfällt. Die parallele Synthese von Zielprotein und Enzym kann demnach die Prozesszeit verkürzen. Allerdings kann durch die Co-Expression das Zellwachstum und Zellvitalität durch die Anreicherung modifizierter Proteine beeinträchtigt werden. Nachteilig sind die daraus resultierenden längeren Kultivierungszeiten. Des Weiteren kann bei der Hydroxylierungsreaktion in

der Zelle die unerwünschte Nebenreaktion zum Dopachinon und/oder zu TOPA nicht beeinflusst werden.

In der Literatur wurde die Co-Expression von dem Fusionsprotein fp-151 mit Tyrosinase aus *Streptomyces antibioticus* (TyrSa) bereits erfolgreich gezeigt [Choi et al., 2012]. Die Wissenschaftler konnten im Vergleich zu *in vitro* modifiziertem fp-151 für das *in vivo* modifizierte Protein eine um das Vierfache erhöhte Zug-Scherkraft (0,8 und 3 MPa) im Materialtest mit Aluminium als Fügeglied zeigen. Allerdings erfolgte der Nachweis der Hydroxylierung mittels MALDI-MS nur im fp-1 Teil des Fusionsproteins (ein von zwei Tyr lag hydroxyliert vor) und es lassen sich keine Rückschlüsse auf den Hydroxylierungsgrad im Gesamtprotein fp-151 ziehen. In einer aktuellen Studie von Yao und Kollegen aus dem Jahr 2022 konnte fp-3B aus *M. galloprovincialis* (Mgfp-3B) erfolgreich mit drei unterschiedlichen mikrobiellen Tyrosinasen in *E. coli* co-exprimiert werden [Yao et al., 2022]. Die *in vivo* Modifikation führte mit den drei getesteten Tyrosinasen zu erhöhter Zug-Scher-Kraft mit Aluminium als Material. Das beste Ergebnis lieferte die Kombination mit Co-Expression der mTyr aus *V. spinosum* mit 0.26 MPa im Gegensatz zu 0.09 MPa, gemessen für das unmodifizierte Mgfp-3B. 87 mg/L modifiziertes Mgfp-3B mit einem Hydroxylierungsgrad von 57,2 % wurden gewonnen (Tabelle 4-2, S. 130). Folglich wurden durchschnittlich ca. sechs von elf Positionen hydroxyliert. Die *in vivo* Modifikation ist basierend auf der aktuellen Literatur eine gute Methodik zur Gewinnung DOPA-modifizierter Proteine für Biomaterialien. Der in der vorliegenden Arbeit genutzte und optimierte *in vitro* Ansatz bietet jedoch zwei entscheidende Vorteile für die Anwendung: 1) der erreichte Hydroxylierungsgrad in den Zielproteinen ist höher und 2) die Reaktionsbedingungen sind kontrollierbar und ermöglichen für zukünftige Biomaterialien bedarfsorientierte Anpassungen.

Tabelle 4-2 Übersicht zum Einsatz der Pilz-Tyrosinase und der mikrobiellen Tyrosinase zur Hydroxylierung Mfp-basierter Proteine und Peptide.

Mfp oder Mfp-basiertes Peptid	Tyr	Enzym	Hydroxylierung	Nachweis von TOPA	Erläuterungen	Literatur
fp-1 Decapeptid	2	muTyr	40 %*	n.a.	Bestimmung mittels Aminosäure Hydrolyse, Erste zeitaufgelöste Messung der Hydroxylierung ohne Betrachtung der Hydroxylierungs-Position: 20 min → 20 % DOPA; 60 min → 30 % DOPA; 150 min → 40 % DOPA	[Marumo und Waite, 1986]
fp-1 Decapeptid	2	muTyr	15 %*	n.a.	Bestimmung mittels Aminosäure Hydrolyse ohne Betrachtung der Hydroxylierungs-Position	[Burzio und Waite, 2000]
fp-1 Decapeptid	2	muTyr	2 – 3**	ja	Erste zeitaufgelöste Messung der Hydroxylierung mit Bestimmung der Position: 1. Tyr <sub>9</sub> → DOPA 2. Tyr <sub>5</sub> → DOPA 3. DOPA <sub>9</sub> → TOPA Nachweis von TOPA mittels Aminosäure Hydrolyse, Edman-Sequenzierung & MS	[Burzio und Waite, 2002]
fp-151	43	muTyr	30 – 35 %*	n.a.	Bestimmung mittels MALDI-MS, Keine Bestimmung der Hydroxylierungs-Position (Keine Aussage zu TOPA)	[Cha et al., 2009]
fp-151	43	His <sub>6</sub> -mTyr	53 %*	n.a.	Bestimmung mittels Aminosäure Hydrolyse ohne Betrachtung der Hydroxylierungs-Position (Keine Aussage zu TOPA)	[Do et al., 2017]
Mgfp-3B	11	mTyr	57,2 %* (6 von 11)	n.a.	Co-Expression von Mgfp-3 und mTyr ( <i>in vivo</i> hydroxylation) Bestimmung mittels MALDI-MS und Säure-Borat-Differenzspektroskopie <sup>1</sup>	[Yao et al., 2022]
Mefp-3	10	His <sub>6</sub> -mTyr	1 – 12**	ja	Gemisch hochgradig hydroxylierter Proteinspezies (1 – 10 OH-Gruppen), Detektion von TOPA und Betrachtung der Hydroxylierungs-Positionen durch ISD/T3-Sequenzierung	Vorliegende Arbeit Abb. 3-11, S. 67
DP1A-Variante	4	His <sub>6</sub> -mTyr	4 – 5**	ja	Detektion von TOPA und Betrachtung der Hydroxylierungs-Positionen durch ISD/T3-Sequenzierung	Abb. 3-18, S. 82
DP2	25	His <sub>6</sub> -mTyr	51 – 52	n.a.	Bestimmung mittels MALDI-MS, ISD/T3-Sequenzierung nicht möglich	Abb. 3-22, S. 89

Decapeptid = AKPSYPPTYK, muTyr = Pilz-Tyrosinase (engl. *mushroom*), His<sub>6</sub>-mTyr = mikrobielle Tyrosinase. \*Hydroxylierungsgrad (Ohne Betrachtung der Ausbildung von TOPA) = Wie viel Prozent der Tyr liegen hydroxyliert vor, \*\*Hydroxylierungen = Anzahl der eingefügten OH-Gruppen, unabhängig von der Bildung an DOPA oder TOPA, n.a. – nicht angegeben/bestimmt. <sup>1</sup>[Waite und Benedict, 1984]

## 4.3 Materialwissenschaftliche Untersuchungen

### 4.3.1 Thermodynamische Untersuchungen zur temperaturabhängigen Strukturänderung der Designer-Proteine

Für die geplanten Anwendungen als Proteinkleber waren thermodynamische Untersuchungen der Designer-Proteine erforderlich, um Aussagen zu temperaturabhängigen strukturellen Veränderungen zu treffen. Bislang wurden Mfp und Mfp-Fusionsproteine mittels Circular dichroismus (CD) [Hwang und Waite, 2012], Surface-Force-Apparatur (engl. *surface force apparatus*, SFA) [Yu et al., 2011b] und Summenfrequenzspektroskopie (engl. *sum frequency generation*, SFG) [Even et al., 2008] analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die Designer-Proteine mittels nanoDSF (engl. *differential scanning fluorimetry*) untersucht (Kap. 3.3.1, S. 91), da bei dieser Methode die Verschiebung der intrinsischen Trp- als auch Tyr-Fluoreszenz beim Entfalten gemessen werden kann. Basierend darauf können Aussagen zu temperaturabhängigen strukturellen Veränderungen getroffen und die sequenzspezifischen Temperaturübergänge ( $T_t$ ) bestimmt werden. Ein Einfluss der Hydroxylierung am Tyr in der Polypeptidkette zu DOPA kann somit direkt über die veränderte Fluoreszenz gemessen werden. Das nanoDSF-Gerät bietet den Vorteil einer schnellen und robusten Analyse für eine umfangreiche funktionelle Charakterisierung des zu untersuchenden Proteins zu Proteininstabilität, Aggregationsverhalten und den Übergangstemperaturen ( $T_t$ ). Im Gegensatz zu CD sind für die Messungen nur sehr kleine Probenvolumen notwendig [Chattopadhyay und Varadarajan, 2019].

Bislang existieren keine DSF-Daten in der Literatur zu Mfp-basierten Proteinsequenzen. Aus den Messungen der vorliegenden Arbeit ließen sich für Mefp-3 und Mgfp-3 keine Temperaturübergänge im Gradienten von 15 – 95 °C bestimmen. Zudem zeigten die Proteine keine Aggregation über den gemessenen Temperaturbereich. Insgesamt konnte durch die Analyse gezeigt werden, dass die Mfp-3 wenig strukturiert vorliegen und folglich kaum eine konformationelle Änderung im Temperaturgradienten stattfindet (Kap. 8.2, Mefp-3: Abb. 8-21, S. 185; Mgfp-3: Abb. 8-22, S. 186). Während der reversen Temperaturrampe wurde die Ausgangsfluoreszenz wieder erreicht ( $\text{Fluoreszenz}_{\text{Start}} = \text{Fluoreszenz}_{\text{Ende}}$ ), was bestätigte, dass die Temperaturänderung kaum Einfluss auf die Mfp-3 hat. Auch in der Literatur werden Mfp allgemein als kleine, relativ unstrukturierte Proteine beschrieben [Ferooshani et al., 2017; Waite, 2017]. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung und des hohen Gly-Gehalts sind Mfp nach empirischen Vorhersagemodellen zur Sekundärstruktur [Chou und Fasman, 1978] sehr flexible Proteine. Mittels CD wurde die Struktur von Mfp-1 (aus *M. californianus*), Mfp-2 und Mfp-3 (aus *M. edulis*) untersucht und alle drei Proteine zeigten eine *extended coil* Struktur in Lösung [Hwang und Waite, 2012]. Von den getesteten Proteinen war Mefp-3 das am wenigsten strukturierte mit einem kleinen Anteil an helikalen Bereichen. Es wird postuliert, dass die vorherrschende *random coil*-Struktur in Mefp-3 dem Protein, und folglich der Muschel, ermöglicht unter verschiedenen Bedingungen im Milieu an diverse Oberflächen zu binden und dabei seine Konformation anzupassen. Diese Eigenschaft sollte in den DP vorteilhaft bei der Wechselwirkung mit der Zieloberfläche ( $\text{SiO}_2$ ) nutzbar gemacht werden. Eine Oberflächen-abhängige Strukturänderung von Mefp-3 mittels SFG konnte von Even und Kollegen nachgewiesen werden [Even et al., 2008]. Die Studien zeigten, dass Mefp-3 an hydrophilen Polymeroberflächen eine mehr oder weniger zufällige Struktur für hydrophobe Seitenketten und Sekundärstrukturen einnimmt. Auf hydrophoben Oberflächen wurden starke SFG-Signale detektiert, was auf eine geordnete Adsorption hinweist. Somit wurde gezeigt, dass Mefp-3 an verschiedenen Grenzflächen unterschiedliche Konformationen annimmt.

Darüber hinaus war die Untersuchung der hydroxylierten Mfp-3 Proteine und der Einfluss auf die strukturellen Eigenschaften von Interesse. In den nanoDSF Analysen, zeigte die DOPA-Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr in Mefp-3 und Mgfp-3 nur geringe Änderungen in den Fluoreszenzeigenschaften. Demzufolge scheint die Hydroxylierung in den Mfp-3 keinen starken Einfluss auf intramolekulare Interaktionen unter Temperaturänderung zu haben. In einer Studie von Yu und Kollegen wurde bereits die strukturelle Änderung von nativen Mefp-3 während der Adhäsion an Mica-Oberflächen sowie der Einfluss der post-translationalen Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA in Mefp-3 und deren weitere Oxidation zu Dopachinon mittels SFA analysiert [Yu et al., 2011b]. Zunächst zeigte Mefp-3 die bekannte *random coil*-Struktur, jedoch nach Reaktion der Tyr über DOPA zu Dopachinon verlor das Protein seine konformationelle Flexibilität und zeigte eine reduzierte optische Aktivität. Durch die zusätzliche Modifikation gehen die Forscher von einer eingeschränkten Flexibilität im Proteinrückrat aus. Die weitere Oxidation zu Dopachinon führte zu einer geringeren Bindung von Mefp-3 an Mica durch die lokalen Konfigurationsbeschränkungen ( $Mefp-3_{DOPA} = 12 \text{ mN/m}$ ,  $Mefp-3_{Dopachinon} = 1,5 \text{ mN/m}$ ). In der vorgelegten Arbeit wurde die Folgereaktion von DOPA zu Dopachinon durch die Zugabe von Ascorbinsäure und Borat zum Puffer verhindert, um die maximalen Bindeeigenschaften zu gewährleisten. Daher ist ein Vergleich mit den Resultaten aus der Arbeit von [Yu et al., 2011b] schwierig, da die strukturelle Änderung von Tyr zu DOPA in den Mfp nicht separat untersucht wurde. Dennoch ist von einer strukturellen Konformationsänderung aufgrund der zusätzlichen Hydroxylgruppen in der Polypeptidkette auszugehen.

Neben den Mfp-Einzeldomänen wurden in der vorliegenden Arbeit die Proteinstabilität, das Aggregationsverhalten sowie die Übergangstemperaturen ( $T_t$ ) für DP1A/B und DP2 untersucht. Diese enthalten neben dem Mfp-3-Block ELP-basierte Proteinsequenzen (Abb. 3-1, S. 51). ELP zeichnen sich durch einen sequenzspezifischen reversiblen Temperaturübergang bei  $T_t$  aus [Girotti et al., 2004]. Durch den Strukturübergang werden die hydrophoben Interaktionen verstärkt und es kommt zur Agglomeration der Polypeptidketten. Dieses Verhalten für ELP wird zur Reinigung mittels *Inverse transition cycling* (ITC) genutzt [Luan et al., 1991; McPherson et al., 1996; Meyer und Chilkoti, 2002; Meyer und Chilkoti, 2004; Schipperus et al., 2012; Urry et al., 1985]. Für die Reinigung von DP1A/B und DP2 mittels ITC war die Bestimmung von  $T_t$  über nanoDSF von Interesse. Die ELP-Sequenz in DP1A/B liegt der Arbeit von Desai und Kollegen zugrunde [Desai et al., 2016]. Die Forscher konnten mittels Trübungsmessungen am Photometer (bei 600 nm) zeigen, dass sich  $T_t$  mit einer höheren Anzahl an Pentapeptid-*repeats*  $(VPGVG)_n$  verringert:  $(n = 50 / T_t = 40 \text{ °C}) > (n = 75 / T_t = 34 \text{ °C}) > (n = 100 / T_t = 31 \text{ °C})$ , die ELP lagen dabei in PBS vor. In DP1A/B wurde ein 75-facher *repeat* eingebaut. In der vorliegenden Arbeit wurden im Durchschnitt mittels nanoDSF ähnliche  $T_t$  (DP1A-Variante = 23,97 °C, DP1B-Variante = 25,07 °C) in der Heizphase bestimmt (Tabelle 3-10, S. 96). Allerdings ist beim Vergleich mit [Desai et al., 2016] zu berücksichtigen, dass DP1A/B in einem Puffer für das ITC (Tabelle 2-14, S. 38) vorlagen. Dieser besitzt eine höhere Ionenstärke und dadurch wird der Übergang zu einer geringeren  $T_t$  verschoben. Zusätzlich wird der zentrale ELP-Block in den DP1 von Mfp-3-Sequenzanteilen flankiert (Abb. 3-1, S. 51 und Abb. 3-16, S. 79) und kann somit die Faltungsprozesse im Temperaturgradienten beeinflussen. Dieses Verhalten ist bereits in der Literatur wie folgt beschrieben. Trabbic-Carlson und Kollegen zeigten den Effekt für sechs verschiedene Fusionsproteine auf  $T_t$  des ELP ( $T_t = 48 \text{ °C}$ ) [Trabbic-Carlson et al., 2004]. Dabei wurde eine negative Korrelation zwischen  $T_t$  und dem Anteil der hydrophoben Oberfläche des fusionierten Partners beobachtet. Beispielsweise senkte die Fusion von ELP mit CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase)  $T_t$  signifikant auf

36 °C. Dem gegenüber steht die Fusion von ELP mit GFP (engl. *Green fluorescent protein*), welches eine relativ hydrophile Oberfläche besitzt. In den Trübungsmessungen am Photometer (bei 350 nm) zeigte diese Fusion eine höhere  $T_t$  (52 °C). In einer weiteren Studie von Park und Kollegen konnte neben dem Einfluss der ELP-Länge (je länger ELP desto niedriger  $T_t$ ), der Einfluss der Trx (Thioredoxin)-Fusion aufgrund der Hydrophobizität bestätigt werden [Park und Won, 2009]. Trx ist etwas hydrophiler als das untersuchte ELP. Da die hydrophobe Wechselwirkung beim ELP-Phasenübergang die treibende Kraft ist, scheint die ELP-Aggregation durch Trx beeinflusst zu werden. Dennoch zeigte Trx keinen starken Einfluss auf die Änderung von  $T_t$  (ELP: 16 °C; Trx-ELP: 18 °C), da die Molekulare Masse von Trx (11,81 kDa) relativ klein ist.

Darüber hinaus wurde in der vorgelegten Arbeit der Einfluss der DOPA-Modifikation in den DP auf struktureller Ebene mittels nanoDSF analysiert (Kap. 3.3.1, S. 91). Bislang wurde die Hydroxylierung Peptid-gebundener Tyr zu DOPA in der Form noch nicht untersucht und lieferte interessante Einblicke in das Faltungsverhalten ELP-basierter Proteine. Für die DP1A-Variante konnte eine deutliche Verschiebung von  $T_t$  (+ 7,7 °C) aufgrund der Modifikation gezeigt werden (Tabelle 3-10, S. 96). Demzufolge beeinflusst die Modifikation von Tyr zu DOPA die Faltung (ELP-Übergang). Des Weiteren zeigten die Messungen der Lichtstreuung, dass die Agglomeration der modifizierten DP1A-Variante 7,1 °C später einsetzte. In der eingangs vorgestellten Studie von [Yu et al., 2011b] wurde ebenfalls durch die DOPA-Modifikation eine eingeschränkte Flexibilität im Rückgrat von Mfp gezeigt. Auch die Schlussfolgerung von [Park und Won, 2009] wurde durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt, dass die Hydrophobizität der Fusionspartner einen Einfluss auf die  $T_t$  von ELP hat. Durch die zusätzlichen OH-Gruppen in den modifizierten DP sind die Proteinanteile hydrophiler und erhöhen das  $T_t$  der ELP-Fusion. Im Gegensatz zu den Resultaten der DP1A-Variante wurde für die DP1B-Variante weder für  $T_t$  noch den Beginn der Agglomeration ein verändertes Verhalten im Vergleich zur nicht-mod. Variante beobachtet. Grund hierfür kann die enzymatische Umwandlung der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA mittels His<sub>6</sub>-mTyr sein. Wie bereits in Kap. 4.2 (S. 123) diskutiert, entsteht bei der Reaktion ein Proteingemisch mit einer unterschiedlichen Anzahl an Hydroxylierungen. Im Fall der mod. DP1B-Variante besteht die Annahme, dass die untersuchten Proteinchargen kaum hydroxyliert wurden. Basierend auf dem Aminosäuresequenz beider DP1 (Abb. 3-24, S. 93) war nicht von einem unterschiedlichen Verhalten in der temperaturabhängigen Strukturänderung auszugehen.

Die Untersuchung von DP2, bestehend aus Mefp-3 als adhäsiven und TE als kohäsiven Block (Tabelle 3-1, S. 51), war ebenfalls für die Reinigung mittels ITC von Interesse. Bislang sind keine Daten zur Untersuchung von TE und TE-basierten Sequenzen mittels nanoDSF in der Literatur beschrieben. Im Allgemeinen sind strukturelle Informationen zu TE auf einzelne Abschnitte in der Polypeptidkette oder der Domänen begrenzt [Ozsvar et al., 2021; Tarakanova et al., 2019]. TE enthält Konformationen wie Poly-Pro-II-Helix (PPII) und  $\beta$ -turns, deren Stabilität stark vom Milieu abhängt [Tamburro et al., 2003]. In Lösung kann TE entweder in einer globulären oder in einer gestreckten Polypeptidkette vorliegen und zeigt damit einen hohen Grad an Flexibilität [Wise und Weiss, 2009], die für dessen Funktionalität *in vivo* unabdingbar ist (Kap. 1.4.2.1, S. 20). Ausschließlich in den Poly-Ala-Domänen sind Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices vorhanden. Für die Reinigung von DP2 mittels ITC (Kap. 3.2.4.2, S. 85) wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Eigenschaft des reversiblen Temperaturübergangs genutzt und eine gezielte und effektive Reinigung aus einem *E. coli* Lysat erstmals gezeigt. In der Literatur wurde bislang nur das Koazervationsverhalten von TE ohne weitere Nutzung untersucht [Vrhovski und Weiss, 1998]. Bei der nanoDSF-Analyse von DP2 ließ sich jedoch kein

detektierbarer Übergang nachweisen. Demnach lässt sich für dieses Protein mit dieser Methode keine verlässliche Aussage zur strukturellen Änderung induziert durch Temperatur treffen. Perspektivisch könnten andere Methoden wie CD genutzt werden.

Aus den Untersuchungen von hydroxylierten DP2 mittels nanoDSF (Kap. 8.2, Abb. 8-20, S. 184) ist davon auszugehen, dass DOPA die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen im Protein verstärkt. Dieses Ergebnis ist jedoch aufgrund der geringen Sensitivität sowie der Probenbeschaffenheit (Proteingemisch, Abb. 3 33, S. 113, Spur 12) unter Vorbehalt zu betrachten. Dennoch war der Einfluss auf die temperaturinduzierte Strukturänderung und Verschiebung von  $T_t$  in einen höheren Temperaturbereich deutlich. Neben den zehn Tyr im Mfp-3-Block enthält DP2 im TE-Block weitere fünfzehn Tyr (Tabelle 3-1, S. 51). Aus diesem Grund hat die Hydroxylierung der Tyr zu DOPA ebenfalls einen Effekt auf die Wechselwirkungen im kohäsiven Block in DP2. Dieser Zusammenhang ist auch für die Nutzung als Bindemittel von Vorteil, da durch die Modifikation zu DOPA die kohäsiven Kräfte verstärkt werden. Die Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA und die anschließende Analyse mittels nanoDSF sind bisher für TE und TE-basierte Sequenzen nicht beschrieben.

### 4.3.2 Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten der Designer-Proteine an SiO<sub>2</sub>-Oberflächen mittels QCM-D

#### 4.3.2.1 Festlegung der Versuchsparameter

Das Adsorptionsverhalten der Designer-Proteine (DP) an eine SiO<sub>2</sub>-Sensoroberfläche wurde in der vorgelegten Arbeit mittels QCM-D untersucht. Die Methode wurde bereits häufig zur Untersuchung der Proteinadsorption von Muschelfußproteinen [Höök et al., 2001; Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2004; Kim et al., 2018] und Mfp-basierter Sequenzen [Hwang et al., 2007; Wilke und Börner, 2012] eingesetzt und schon kleinste Massenänderungen können in Echtzeit bis in den Nanogramm-Bereich (ng/cm<sup>2</sup>) detektiert werden [Rodahl et al., 1997]. Eine vergleichende Literaturübersicht zu den QCM-Analysen Mfp-basierter Proteine ist in Tabelle 4-3 (S. 139) dargestellt. Die Resultate werden in Kap. 4.3.2.2 (S. 137) diskutiert. Allgemein sind in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben zum Versuchsaufbau sowie der Messparameter zu finden. In den früheren Arbeiten von Hwang und Kollegen [Hwang et al., 2005; Hwang et al., 2007; Hwang et al., 2004] erfolgte eine Trocknung der Mfp nach Probenauftragung auf einen Goldsensor. Folglich wurde nicht das Adsorptionsverhalten während der Proteinapplikation untersucht, sondern nur die finale Frequenzänderung der getrockneten Probe. Dieser Versuchsaufbau lässt keine Aussagen auf Adsorption- und Desorptionsprozesse in Echtzeit zu und war somit für die Untersuchungen der DP nicht geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodik nach [Petroni et al., 2015] ausgewählt (Kap. 2.2.7.1, S. 48). Zur Optimierung der Messbedingungen für die Adsorption der DP an eine SiO<sub>2</sub>-Sensoroberfläche wurde zusätzlich der Einfluss verschiedener Parameter getestet: I) Proteinkonzentration (Kap. 3.3.2.1, S. 97), II) Applikationszeit (Kap. 3.3.2.2, S. 99) und III) Messtemperatur (Kap. 3.3.2.3, S. 100). Diese Ergebnisse zeigten, dass die applizierte Proteinmenge, das Milieu, die Messzeit als auch die Dauer der Proteinapplikation einen großen Einfluss auf die finale Frequenzänderung ( $\Delta f$ ) haben können. Aufgrund der Probenbeschaffenheit und des äußeren Milieus sind einige Aspekte während der Proteinapplikation zu beachten und sollen im Folgenden diskutiert werden.

#### I) Proteinkonzentration

In der Literatur wurde der Zusammenhang zwischen der aufgetragenen Proteinmenge und der Frequenzänderung in QCM-D Messungen bereits für unterschiedliche Proteine gezeigt: IgG [Ogi et al., 2007],  $\beta$ -Casein [Lee et al., 2004], Fibrinogen [Hemmersam et al., 2005] und ELP [Alvisi et al., 2021; Srokowski und Woodhouse, 2013]. In der vorliegenden Arbeit konnten ebenfalls höhere  $\Delta f$  mit steigender Proteinkonzentration der DP1A-Variante erzielt werden (Abb. 3-26, S. 98). So wurde beispielsweise das höchste  $\Delta f$  der Versuchsreihe mit  $690,4 \pm 8,71$  Hz für eine Konzentration von  $0,4$  mg/mL bestimmt. Aufgrund der Proteineigenschaften kam es jedoch unter den getesteten Bedingungen verstärkt zu intra- und intermolekularen Wechselwirkungen und die Löslichkeit der DP1A-Variante nahm mit höheren Konzentrationen ab. Die Ausbildung von Proteinagglomeraten war bereits ab einer Konzentration von  $0,2$  mg/mL durch Trübung der Lösung zu beobachten und konnte durch DLS-Messungen (Kap. 8.2, Abb. 8-23 und Tabelle 8-9, S. 188) bestätigt werden. Diese Proteinagglomerate riefen in den Frequenzplots eine starke transiente Frequenzabnahme hervor, welche jedoch nicht die Proteinadsorption an die  $\text{SiO}_2$ -Oberfläche widerspiegelt, sondern vielmehr eine temporäre Ablagerung der Proteinaggregate auf dem Sensor (Kap. 3.3.2.1, S. 97). Trotz der höheren finalen  $\Delta f$ -Werte mit steigender Proteinkonzentration, sind diese Ergebnisse unter Vorbehalt zu betrachten. Zudem stellt die Ausbildung von Proteinagglomeraten eine potenzielle Ursache von Blockierungen der Pumpenschläuche im System dar. Die spezifische Interaktion zwischen ELP-Polypeptiden und das Koazervationsverhalten sind neben den Pufferbedingungen auch von der ELP Länge (höheres Molekulargewicht, MW) abhängig [Desai et al., 2016; Girotti et al., 2004; Meyer und Chilkoti, 1999; Meyer und Chilkoti, 2004; Urry et al., 1985] (Kap. 1.4.2.1, S. 20). Dies zeigt sich auch beim Vergleich von Literaturdaten. In den Arbeiten von [Alvisi et al., 2021; Srokowski und Woodhouse, 2013] kam es bei höheren Konzentrationen der ELP mit einem MW von  $1,2 - 20$  kDa nicht zur Ausbildung von ELP-Proteinagglomeraten während der QCM-Messung. Hingegen wurden Aggregate eines ELP-RGD-Polymers ( $60,6$  kDa) bei einer Konzentration von  $0,1$  mg/mL in PBS mittels DLS gezeigt [Costa et al., 2009]. In der vorliegenden Arbeit wurde nach massenspektrometrischer Analyse ein MW der DP1A-Varinate von  $34,8$  kDa nachgewiesen (Abb. 3-18, S. 82). Demzufolge ist schon bei geringeren Konzentrationen von stärkeren Interaktionen auszugehen. Um Proteinablagerungen der DP1A-Varinate während der QCM-D-Messungen zu vermeiden und verlässliche Daten zu generieren, wurde in den Untersuchungen zur Proteinadsorption der DP in der vorgelegten Arbeit eine Proteinkonzentration von  $0,1$  mg/mL verwendet.

## II) Applikationszeit

Aus den Versuchen zur Applikationszeit (Kap. 3.3.2.2, S. 99) wurden zwei Phasen während der Proteinauftragung bestimmt. In der 1. Phase wird die  $\text{SiO}_2$ -Sensoroberfläche mit Protein benetzt, während in der 2. Phase bereits Proteinschichten (*multilayer*) durch die kohäsiven Eigenschaften des ELP-Blocks zwischen den Monomeren der DP1A-Variante ausgebildet werden. Um den Einfluss einer verlängerten Applikationszeit auf das finale  $\Delta f$  zu überprüfen, wurde die Frequenzänderung bis zu 30 min verfolgt (Abb. 3-27, S.100). Anhand der QCM-Daten war die Ausbildung der Proteinschichten nach 30-minütiger Applikationszeit noch nicht abgeschlossen. Jedoch wurden diese *multilayer* im darauffolgenden Waschschrift mit PBS unter den getesteten Bedingungen wieder vollständig gelöst. Die finalen  $\Delta f$ -Werte waren unabhängig von der Proteinapplikationszeit (10 oder 30 min) (Tabelle 3-12, S.100). Aus der Literatur sind häufig keine zeitaufgelösten Frequenzplots (QCM-D) für Mfp-basierte Sequenzen gezeigt und ein Zusammenhang zwischen  $\Delta f$  und der Applikationszeit wurde bislang nicht im Detail untersucht. Die QCM-Daten sind oft als Säulendiagramm dargestellt und das Adsorptionsverhalten wird nicht separat beschrieben. Die Arbeit von [Petroni et al., 2015] zeigt

Frequenzplots in einem Zeitfenster von 7,5 min mit einer kurzen Applikationszeit von 2 min. In den Untersuchungen von [Wilke und Börner, 2012] zur Adsorption eines Mefp1-basierten Konjugats (AKPSYPPTYK–Polyethylenoxid) auf eine Stahloberfläche erfolgte die Probenauftragung für 90 min. Die Ausbildung eines stabilen  $\Delta f$  war jedoch nach dieser Zeit noch nicht erreicht. Der Aspekt der Applikationsdauer wurde von den Forschern nicht weiter betrachtet. In der hier vorgelegten Arbeit wurde gezeigt, dass das finale  $\Delta f$  nach dem Waschschrift unabhängig von der Dauer der Proteinauftragung ist und folglich auf 10 min festgelegt werden konnte.

Die aufgestellte Hypothese, dass sich bei DP1 die Proteinauftragung in zwei Phasen unterteilen lässt und die finalen  $\Delta f$ -Werte unabhängig von der Applikationsdauer sind, wurde auch durch die Ergebnisse der Mfp-3 Einzeldomänen bestätigt. Ein stabiles  $\Delta f$  war in den Untersuchungen von Mfp-3 und Mgfp-3 bereits nach 5 min Proteinapplikation erreicht (Abb. 8-29, S. 191). Bei den Mfp-3 kam es unter den getesteten Bedingungen erwartungsgemäß nicht zur Ausbildung von Proteinschichten und nach max. 5 min war die Benetzung der SiO<sub>2</sub>-Sensoroberfläche abgeschlossen. Dennoch wurde zur Vergleichbarkeit aller DP eine Applikationszeit von 10 min festgelegt.

### III) Messtemperatur

Im Hinblick auf den thermoresponsiven ELP-Bock in der DP1A-Variante waren die QCM-Untersuchungen zur Messtemperatur (Kap. 3.3.2.3, S. 100) von großem Interesse. Der ELP-Block zeichnet sich durch einen reversiblen Temperaturübergang bei einer sequenzspezifischen Übergangstemperatur ( $T_t$ ) aus (Kap. 1.4.2.1, S. 20). In der vorgelegten Arbeit sollte diese Eigenschaft sowohl für das Adsorptionsverhalten an eine Zieloberfläche (SiO<sub>2</sub>), als auch für das Kohäsionsverhalten zur Ausbildung von Proteinschichten untersucht werden. Neben der Temperaturabhängigkeit der zu untersuchenden DP, ist auch der Einfluss der Messtemperatur auf den Quarz-Sensor zu beachten. Dieser Zusammenhang wurde bereits häufig in der Literatur beschrieben [Lee et al., 2020; Walls und Gagnepain, 1992; Wessels et al., 2013]. Äußere Einflüsse wie Temperatur, Druck und Feuchtigkeit beeinflussen die Oszillation des Schwingquarzes, der zu einer Frequenzverschiebung führt [Walls und Gagnepain, 1992]. Da in der vorgelegten Arbeit ausschließlich die finalen Frequenzänderungen miteinander verglichen wurden, ist dieser Aspekt vernachlässigbar. Insgesamt konnten im Durchschnitt vergleichbare finale  $\Delta f$ -Werte mit steigender Temperatur ermittelt werden (Tabelle 3-13, S. 102). Jedoch unterscheiden sich die Frequenzplots im Verlauf der Proteinapplikation sowie des Waschschrifts für die getesteten Temperaturen deutlich. Nach 10-minütiger Probenauftragung steigt  $\Delta f$  im Verlauf der Messung mit zunehmender Temperatur auf folgende Maximalwerte:  $\Delta f_{15^\circ\text{C}} \sim 245 \text{ Hz}$ ;  $\Delta f_{25^\circ\text{C}} \sim 300 \text{ Hz}$ ;  $\Delta f_{35^\circ\text{C}} \sim 460 \text{ Hz}$  (Abb. 3-28, S. 102). Die Begründung liegt auch hier in den intra- und intermolekularen Interaktionen durch den ELP-Teil in der DP1A-Variante. Bereits im Probengefäß konnte bei 35 °C eine Trübung der Lösung durch die Ausbildung von Aggregaten beobachtet werden. Dadurch kam es zu starken Schwankungen im Kurvenverlauf der Frequenzplots (Abb. 3-28, S. 102, blau) und die Ergebnisse sind für diese Temperatur nicht aussagekräftig (Standardabweichung von  $\pm 159,08 \text{ Hz}$ ). Neben der Ausbildung von Proteinschichten kam es sehr wahrscheinlich zur Ablagerung von Proteinaggregaten auf den Sensor, die leicht mit PBS abgespült werden konnten. Ebenfalls konnte dieser Zusammenhang mittels nanoDSF in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Kap. 3.3.1, Abb. 3-23 C, grüne Kurve, S. 92). Der Beginn der Agglomeration konnte durch die Zunahme der Lichtstreuung bei 23 °C nachgewiesen werden. Folglich liegt die DP1A-Variante bei 35 °C bereits agglomeriert vor. Die Zugänglichkeit bzw. Flexibilität zur optimalen Adsorption an der Sensoroberfläche ist nicht oder wenn eher zufällig gegeben. Dies zeigte sich auch in der hohen SD ( $236 \pm 159 \text{ Hz}$ ,

Tabelle 3-14, S. 105). Als Ausblick und Optimierung des Versuchsaufbaus könnte die Proteinapplikation auf den SiO<sub>2</sub>-Sensor unterhalb von T<sub>t</sub> (~ 24 °C, Abb. 3-23, S. 92) stattfinden, um die Ausbildung von Mikroaggregaten zu vermeiden. Anschließend können die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen durch Erhöhung der Temperatur in der Messzelle auf 35 °C induziert werden. Dadurch wird zunächst die Adsorption an die SiO<sub>2</sub>-Oberfläche bei T < T<sub>t</sub> gewährleistet (im Idealfall vollständige Benetzung des Sensors) und im Anschluss kommt es erst durch die Temperaturerhöhung zur Ausbildung von Proteinschichten. Zusätzlich könnte eine Oberflächenanalyse der ausgebildeten Proteinschichten mittels AFM eine dreidimensionale Abbildung ermöglichen und weitere interessante Einblicke liefern. Basierend auf den Literaturdaten und verschiedenen gezielten Analysen der vorliegenden Arbeit wurde eine verlässliche Bedingung für vergleichende Experimente für die DP definiert. Diese können die bisherigen QCM-Erkenntnisse bestätigen und erweitern.

#### 4.3.2.2 Vergleichende Untersuchungen zur Proteinadsorption

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Adsorptionsverhalten der Designer-Proteine (DP) ohne und mit Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA mittels QCM-D untersucht. Basierend auf der Grundidee zur Entwicklung eines Formaldehyd-freien bio-basierten Klebstoffs auf Proteinbasis (Kap. 1.3.1, S. 9) wurde Sand, bestehend aus SiO<sub>2</sub> (Mica), als Zieloberfläche festgelegt. Die Adhäsion von Mfp an Mica-Oberflächen wurde in der Literatur bereits mittels SFA (engl. *surface force apparatus*) bestätigt. Die Untersuchungen zur Interaktion der verschiedenen Mfp wurden in dem Übersichtsartikel von Lee und Kollegen zusammengefasst [Lee et al., 2011]. Bei diesen SFA-Analysen wurde die stärkste Adhäsion mit Monolayern aus Mfp-3 mit einer Adhäsionsenergie von - 2,5 mJ/m<sup>2</sup> bei pH 3 gezeigt [Yu et al., 2011b]. Damit liegen die Adhäsionsenergien im Bereich von Streptavidin-Biotin (-10 mJ/m<sup>2</sup>), der als Maßstab für nicht-kovalente Wechselwirkungen von Proteinen gilt [Helm et al., 1991]. Untersuchungen mit AFM (engl. *atomic force microscopy*) zeigten zudem, dass DOPA stark an Metalloxid-Oberflächen bindet [Lee et al., 2006]. Auch durch die Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr in GFP zu DOPA wurde eine stärkere Adsorption an TiO<sub>2</sub>-Oberflächen im Vergleich zu GFP mittels QCM gezeigt [Deepankumar et al., 2017]. Mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie (DFT, engl. *density functional theory*) wurde die starke Bindung der Catechol-Funktion ebenfalls an Silica-Oberflächen bewiesen [Mian et al., 2010]. In einer Folgestudie der gleichen Arbeitsgruppe wurde mittels Molekulardynamik-Simulationen (MD, engl. *molecular dynamics*) gezeigt, dass die Catechol-Gruppe in Mfp in der Lage ist einen Teil der Wassermoleküle zu verdrängen und sich mit Wasserstoffbrückenbindungen und Dispersionskräften an die Oberfläche zu haften [Mian et al., 2014]. Dieser Prozess ist reversibel und für das Überleben der Muschel im Meer essentiell.

In den QCM-D-Analysen der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens der DP auf die SiO<sub>2</sub>-Sensoroberflächen (Kap. 3.3.2.4.1, S. 102) führte die Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken in der DP1A-Variante zu einer verbesserten Adsorption um Faktor 6,7 (∅ = 233 Hz) im Vergleich zu den adhäsiven Mfp-3-Einzelblöcken (∅ = 35 Hz) (Abb. 3-29, S. 104). Zusätzlich konnte durch die Hydroxylierung der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA bei allen DP mittels der rekombinant hergestellten mikrobiellen Tyrosinase (Kap. 3.2.1.2, S. 54) die Wechselwirkung erhöht werden. Das beste Ergebnis lieferte die modifizierte DP1A-Variante mit einer finalen Frequenzänderung von 298 ± 21,9 Hz. Insgesamt konnten die QCM-D-Daten die Arbeitshypothese der vorgelegten Arbeit bestätigen. Die adhäsiven Blöcke (Mefp-3 und Mgfp-3) ermöglichten die Haftung an die Oberfläche, während die

zusätzlichen kohäsiven Blöcke in den DP (DP1A-Variante und DP2) zur inneren Festigkeit und Stabilität beigetragen haben.

Eine vergleichende Literaturübersicht ist in Tabelle 4-3 (S. 139) zu den QCM-Analysen dargestellt. In der Studie von [Kim et al., 2018] konnten beispielsweise für das Muschelfußprotein 5 aus *Mytilus galloprovincialis* Frequenzänderung von ca. 20 Hz (unmodifiziert, Mgf-5) bis ca. 40 Hz (modifiziert, Mgf-5<sub>DOPA</sub>) mittels QCM für Gold-beschichtete Quarzsensoren bestimmt werden. Für das Strukturprotein Mefp-1, das die schützende Außenhaut der Byssusfäden in der Muschel bildet, wurde ebenfalls für Gold-Sensoren ein finales  $\Delta f$  von 58 Hz bestimmt [Höök et al., 2001]. Damit liegen die in der vorliegenden Arbeit bestimmten  $\Delta f$ -Werte der Mfp-3-Einzeldomänen im Bereich der Literaturangaben anderer getesteter Mfp. Ein direkter Vergleich ist nicht möglich, da keine Analysen mit dem typischen QCM-Ablauf (Äquilibrierung, Proteinapplikation, Waschschrift) für Mfp-3 publiziert sind.

Neben den adhäsiven Mfp-3-Domänen sind auch Daten zu ELP-basierten Sequenzen in Kombination mit adhäsiven Protein-Blöcken aufgelistet. In der Arbeit von [Costa et al., 2009] wurde die Adhäsion eines ELP-RGD-Polymer auf Chitosan-beschichtete Sensoren (140 Hz) und Quarzsensoren ohne Beschichtung (70 Hz) untersucht. Die angegebenen  $\Delta f$ -Werte sind vergleichbar mit den Daten zu mod. DP2 ( $101,3 \pm 18$  Hz) an die SiO<sub>2</sub>-Sensoren. Im Allgemeinen sind der Literatur wenige Adhäsionsstudien zu ELP-basierten Sequenzen mittels QCM zu entnehmen, weil die Polymere häufig mittels anderer Verfahren wie Instron, SPR, AFM untersucht wurden. Darüber hinaus wurden in QCM-Analysen oft andere Sensoren, je nach Anwendung des ELP-basierten Biopolymers, eingesetzt. Aus diesem Grund ist ein Vergleich der vorgestellten Literaturdaten mit den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten schwierig. Einzig die Studie von Li und Kollegen eignet sich für einen direkten Vergleich. Die Forscher produzierten ein Copolymer bestehend aus ELP und einem Silica-Bindemotiv (Silaffin R5 – SSKKSGSYSGSKGSKRRIL) rekombinant in *E. coli* [Li et al., 2018]. Die gereinigten Silaffin-funktionalisierten ELP zeigten in den QCM-Analysen bei 25 °C in PBS eine doppelt so hohe Adhäsion an die SiO<sub>2</sub>-Sensoren mit 110 Hz im Vergleich zum ELP-Einzelblock mit 50 Hz. Zusätzlich wurde der Einfluss der Temperatur auf die Adsorption untersucht. Bei 50 °C wurden 200 Hz für Silaffin-ELP und 125 Hz für ELP erhalten. In der vorliegenden Arbeit konnte die Kombination aus Mefp-3-Sequenzanteilen und ELP (DP1A-Variante) im Mittel ein finales  $\Delta f$  von  $233 \pm 6,9$  Hz bei 25 °C bestimmt werden. Die Funktionalisierung durch Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA verbesserte die Adhäsion auf  $298 \pm 21,9$  Hz. Somit wurde für die mod. DP1A-Variante bei einer gleichen Messtemperatur von 25 °C ein ~ 3-fach höherer  $\Delta f$ -Wert im Vergleich zum Silaffin-ELP aus der Arbeit von [Li et al., 2018] erzielt. Zusammenfassend konnte der positive Einfluss der zusätzlichen Hydroxylierungen der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA aller getesteten DP auf die Adsorption an die hydrophile Sensoroberfläche bestätigt werden. Im Rahmen der vorgelegten Arbeit war eine weiterführende Charakterisierung der DP an den Klebeflächen nicht geplant, da die Untersuchungen zur Bestimmung der Klebekraft an SiO<sub>2</sub>-Oberflächen mittels QCM-D und der Werkstoffprüfung im Fokus standen.

Tabelle 4-3 Literaturvergleich zur Proteinadsorption Mfp- und ELP-basierter Sequenzen bestimmt mit QCM

Protein	Messparameter	OF	$\Delta f$ (Hz)	T (°C)	Literatur
<b>Mfp-basierte Sequenzen</b>					
Mgfp-5	10 $\mu$ M (~ 0,1 mg/mL) in PBS, $t_{\text{Appl}}$ = 60 min, Flow: 10 $\mu$ L/min	Au	20,0	n.d.	[Kim et al., 2018]
Mod. Mgfp-5		Au	40,0		[Kim et al., 2018]
Mefp-1	25 $\mu$ g/mL in 0,1 M Acetatpuffer (0,75 M NaCl, pH 5,5), $t_{\text{Appl}}$ = 45 min, Flow: n.d.	CH <sub>3</sub> -Endgruppe	58,0	22	[Höök et al., 2001]
Pvfp		Au		n.d.	[Petrone et al., 2015]
Pvfp-3 $\alpha$	0,1 mg/mL in 10 mM HAc, $t_{\text{Appl}}$ = 2 min, Flow: 50 $\mu$ L/min	TiO <sub>2</sub>	5,4		
Pvfp-5 $\beta$			12,8		
Pvfp-6			9,7		
MAP(Peptide)	50 mg/mL in 0,8 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,5), $t_{\text{Appl}}$ = 60 – 180 min, Flow: 30 $\mu$ L/min	Stahl	19,0	22	[Wilke und Börner, 2012]
<b>Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken</b>					
ELP-RGD	1 mg/mL in PBS, $t_{\text{Appl}}$ $\geq$ 30 min, Flow: 50 $\mu$ L/min	Au	70,0 – 140,0	25	[Costa et al., 2009]
Silaffin-ELP:					
ELP <sub>120</sub>	40 $\mu$ M in PBS, $t_{\text{Appl}}$ $\geq$ 30 min, Flow: 50 $\mu$ L/min	SiO <sub>2</sub>	50	25	[Li et al., 2018]
Silaffin-			125	50	
ELP <sub>120</sub>			110	25	
			200	50	
<b>Mfp-3 Einzeldomänen</b>					
Mefp-3	0,1 mg/mL in 5 % HAc, $t_{\text{Appl}}$ = 10 min, Flow: 60 $\mu$ L/min	SiO <sub>2</sub>	58,2 $\pm$ 4,6	25	vorliegende Arbeit
Mod. Mefp-3			70,8 $\pm$ 8,8	25	
Mgfp-3			12,5 $\pm$ 6,6	25	
Mod. Mgfp-3			23,0 $\pm$ 4,1	25	
<b>Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken</b>					
DP1A-	0,1 mg/mL in 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl (pH 8), $t_{\text{Appl}}$ = 10 min, Flow: 60 $\mu$ L/min	SiO <sub>2</sub>	233,2 $\pm$ 6,9	25	vorliegende Arbeit
Variante					
Mod. DP1A-			298,0 $\pm$ 21,9	25	
Variante					
DP2	0,1 mg/mL in 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 200 mM NaCl (pH 8), $t_{\text{Appl}}$ = 10 min, Flow: 60 $\mu$ L/min		41,0 $\pm$ 5,3	25	
Mod. DP2			101,3 $\pm$ 18,0	25	

OF – Oberfläche, ELP – Elastin-ähnliche Peptide, RGD – Sequenzmotiv von Proteinen der Extrazellulären Matrix zur Zelladhäsion, Silaffin-tag – MSSKKSGSYSGSKGSKRRIL, mod. – modifizierte Proteinvariante (Hydroxylierung der Tyr zu DOPA)

### 4.3.3 Untersuchungen zu den Klebeeigenschaften der Designer-Proteine

Zu Beginn der Messungen der Zug-Scher-Kräfte der Designer-Proteine (DP) wurden Vorversuche zur Testung der Probenvorbereitung sowie des geeigneten Lösungsmittels (Kap. 3.3.3, S. 109) durchgeführt. Während der Etablierung haben sich in der Vorbereitung der Prüfkörper folgende Herausforderungen ergeben: inhomogene Probenauftragung aufgrund der Probenbeschaffenheit (Klebrigkeit), Probenaustritt aus der Klebefuge oder Bruch des Fügeteils (Miccaplatte). Daraus resultierte die finale Methode zur Bestimmung der Zug-Scher-Kräfte der DP (Kap. 2.2.7.2, S. 50). In den relevanten Literaturstellen zum Vergleich der Zug-Scher-Kräfte der DP mit Daten anderer Mfp- und ELP-basierter Sequenzen wurde der Aspekt der Probenapplikation nicht hinreichend thematisiert (Tabelle 4-4, S. 143). Dennoch ist beispielsweise bei einer Proteinkonzentration auf dem Fügeteil von 500 mg/mL modifiziertem fp-151 in 5 % HAc davon auszugehen, dass es auch hier zu ähnlichen Herausforderungen bei der Probenvorbereitung kam [Choi et al., 2012]. Dies sind jedoch lediglich Mutmaßungen basierend auf eigenen praktischen Erfahrungen. Aus den Vorversuchen wurden 50 mM NaAc (pH 5) als Lösungsmittel für die DP festgelegt. Zum einen war bei den modifizierten Proteinvarianten von einer stärkeren Interaktion der Polypeptidketten auszugehen, was einen Einfluss auf das Homogenisieren der Proteine auf den Fügeteilen haben kann, und zum anderen sind die Interaktionen der Catechol-Seitenkette (DOPA) an Grenzflächen bei saurem pH-Wert sehr vielfältig: H-Brückenbindungen, sowie elektrostatische, hydrophobe und koordinative Wechselwirkungen (Abb. 1-10, S. 16).

Betrachtet man die ermittelten Klebeeigenschaften an SiO<sub>2</sub>- und Al-OF der adhäsiven Einzeldomäne Mefp-3, konnten unabhängig der Zieloberfläche vergleichbare Zug-Scher-Kräfte (SiO<sub>2</sub>-OF: 0,95 MPa; Al-OF: 0,68 MPa) gemessen werden. Dieses Ergebnis für rekombinantes Mefp-3 bestätigte die für native Mfp publizierten Haftungseigenschaften an verschiedene Oberflächen [Lee et al., 2006; Waite, 2017; Waite und Tanzer, 1981]. In der Literatur liegen die Daten zu adhäsiven Einzeldomänen in einem ähnlichen Größenbereich (Tabelle 4-4, S. 143). Beispielsweise wurde bei Messungen an Al-OF eine Zug-Scher-Kraft von 0,57 MPa für die Mfp-3 Variante aus *M. galloprovincialis* (Mgfp-3) erhalten [Yang et al., 2013]. In der vorliegenden Arbeit wurde durch Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA mittels His<sub>6</sub>-mTyr ein Proteingemisch aus Mefp-3-Spezies mit einer unterschiedlichen Anzahl an Hydroxylierungen generiert (Abb. 3-11, S. 67). Somit waren in der Probe mit mod. Mefp-3 Proteinvarianten mit 1 – 10 OH-Gruppen nachweisbar. Die Zug-Scher-Kräfte der modifizierten Variante waren unabhängig von der Zieloberfläche im Durchschnitt doppelt so hoch im Vergleich zu Mefp-3. Betrachtet man die Literaturdaten modifizierter Mfp sind die angegebenen Zug-Scher-Kräfte sehr divers und variieren je nach Prüf- und Messbedingung (Tabelle 4-4, S. 143). An Al-OF wurden für die mod. Proteinvarianten aus *M. galloprovincialis* 0,94 ± 0,33 MPa für Mfp-3 und 0,69 ± 0,17 MPa für Mfp-5 bestimmt [Yang et al., 2013]. In der vorgelegten Arbeit zeigte mod. Mfp-3 aus *M. edulis* (Mefp-3) eine Zug-Scher-Kraft von 1,68 MPa an SiO<sub>2</sub>-OF und 1,39 MPa an Al-OF. Folglich war die Klebkraft von mod. Mefp-3 an Al-OF stärker als vergleichbare Mfp. Darüber hinaus wurden in der Literatur Proteinfusionen aus unterschiedlichen Mfp der Gattung *M. galloprovincialis* produziert und auf ihre Materialeigenschaften geprüft. Dabei konnten für eine Fusion aus Mfp-1 und Mfp-5 (Mfp-151) 0,33 MPa (Konditionierung für 22 h bei 45 °C) [Cha et al., 2009] und 0,8 MPa (Konditionierung für 3 h bei 37 °C) [Choi et al., 2012] bestimmt werden. Nach Hydroxylierung der Tyr zu DOPA in den Mfp-Fusionen, variierten die ermittelten Zug-Scher-Kräfte je nach Messbedingung an Al-OF von 0,4 – 0,86 MPa für mod.

Mfp-151 [Cha et al., 2009], 1,64 MPa für mod. Mfp-131 und 3,01 MPa für mod. Mfp-151 [Choi et al., 2012]. Der zuletzt genannte Wert stammt aus der Co-Expression von Mfp-151 und mikrobieller Tyrosinase in *E. coli*. Durch *in vivo* Modifikation der Tyrosine zu DOPA konnte vermutlich ein höherer Hydroxylierungsgrad im Vergleich zum *in vitro* Ansatz und damit eine verbesserte Klebkraft erzielt werden. Jedoch erfolgte der Nachweis der Hydroxylierung mittels MALDI-MS nur im fp-1 Teil des Fusionsproteins und es lassen sich keine Rückschlüsse auf den Hydroxylierungsgrad im Gesamtprotein fp-151 schließen. Im Vergleich mit den Literaturangaben ist festzuhalten, dass das in der vorliegenden Arbeit rekombinant produzierte und *in vitro* mod. Mefp-3 (mittels His<sub>6</sub>-mTyr) als einzelne adhäsive Sequenz bessere Klebeeigenschaften als vergleichbare Fusionen Mfp-basierter Sequenzen zeigte.

Die Analyse von TE als kohäsiver Einzelblock ergab erwartungsgemäß geringe Zug-Scher-Kräfte ( $0,33 \pm 0,07$  MPa) im Vergleich zum adhäsiven Einzelblock (Mefp-3). Anhand der Bruchbildbeurteilung war bei allen Proben mit TE ein Adhäsionsbruch nachzuweisen, da in diesem Strukturprotein vorwiegend kohäsive Kräfte herrschen und nur eine geringe Bindung an die SiO<sub>2</sub>-OF auftrat. Vergleichend wurden die Zug-Scher-Eigenschaften der DP1A/B-Varianten untersucht. Insgesamt wurden für die DP1 ähnliche Werte wie für TE erhalten und zeigten somit die geringsten Bindungskräfte aller untersuchten Proteine an SiO<sub>2</sub>-OF. Dies liegt vermutlich an der Degradation des ursprünglich geplanten Zielproteins (Abb. 3-16, S. 79). Durch den N- und C-terminalen Abbau im adhäsiven Block (Mfp-3) enthalten die DP1A/B-Varianten nur geringe Sequenzanteile, die für die Adhäsion des Proteinklebers an die Zieloberfläche sorgen. Die Bruchbildbeurteilung dieser Proben stützt diese Hypothese, da es bei allen Prüfkörpern zum Adhäsionsbruch (Bruch an der Haftungsoberfläche zwischen Klebstoff und Fügeteil) kam. Anhand der optischen Beurteilung kann gesagt werden, dass die DP1A/B-Variante wie ein Proteinfilm von der Mica-Platte abgezogen werden konnte (Kap. 3.3.3, Abb. 3-32, S. 110). Demzufolge waren keine Klebstoffreste am Prüfkörper vorhanden. Dieses Bruchergebnis zeigt eine ungenügende Klebstoffhaftung am Fügeteil. Beschriebene Ursachen der mangelnden Haftung des Klebstoffs können neben den fehlenden adhäsiven Kräften, eine fehlende oder falsche Oberflächenbehandlung oder eine unzureichende Klebstoffhärtung sein. Allerdings zeigen auch hochfeste Klebstoffe wie Phenolharzklebstoffe selbst unter optimalen Bedingungen Adhäsionsbrüche [Bader, 2015]. In den Versuchen mit der DP1A/B-Variante sind folglich die kohäsiven Kräfte (ELP-Block) unter den getesteten Bedingungen dominierend. Zusätzlich zeigte ein Vergleich beider Proteine, dass im Mittel für die DP1A-Variante stärkere Zug-Scher-Kräfte gemessen wurden. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit beider Proteine (Abb. 3-24, S. 93) war dieses Ergebnis etwas überraschend. Der einzige Unterschied liegt in der N-terminalen Sequenz der verbliebenen Mfp-3-Domäne. Ein Einfluss des Sequenzanteils konnte auch in den nanoDSF-Analysen auf die temperaturabhängige Strukturänderung der DP1A/B-Varianten nachgewiesen werden (Kap. 3.3.1, S. 91). Demnach zeigen bereits kurze Sequenzabschnitte mit fünf AS eine Änderung in den Struktur- als auch Bindeeigenschaften Mfp-basierter Proteine. In der Literatur wurden bereits kurze Mfp-Peptide auf deren Oberflächenbindung untersucht. Dabei wurden Zusammenhänge zwischen der benachbarten AS zu DOPA in PEG-konjugierten Dipeptiden nachgewiesen [Li et al., 2017]. Die stärkste Zug-Scher-Kraft ergab die Kombination von Lys-DOPA. Aus der Analyse ging hervor, dass Lys die Oberflächenbindung von DOPA durch verschiedene Mechanismen positiv beeinflussen kann. Dazu zählt die Verdrängung von Oberflächenwasser und Ionen zur Vergrößerung der effektiven Bindestellen, sowie die direkte Beteiligung von Lys an der sequenzabhängigen kooperativen Oberflächenbindung bestätigt durch AFM-Analysen. Aus den untersuchten Dipeptiden war die Zug-Scher-Kraft von DOPA-Gly am geringsten. Diese Kombination findet sich auch in der

untersuchten DP1B-Variante wieder, allerdings ohne Modifikation (Tyr-Gly) und könnte als mögliche Ursache der geringen Adhäsion dienen.

Im Folgenden soll der Einfluss der Hydroxylierung auf die Bindeeigenschaften der DP1A-Variante diskutiert werden. Die Zug-Scher-Kräfte der mod. DP1A-Variante erhöhten sich im Mittel ( $0,53 \pm 0,06$  MPa) um den Faktor 2 im Vergleich zur nicht-mod. Variante ( $0,23 \pm 0,1$  MPa). Da Peptid-gebundene Tyr nur im adhäsiven Block vorkommen, ist dieser Effekt eindeutig auf den Mefp-3-Teil im Protein zurückzuführen und bestätigt, dass DOPA ein Schlüssel-molekül der Adsorption dargestellt [Deming, 1999; Lee et al., 2006]. Darüber hinaus zeigte die Untersuchung eines Proteingemisches („Blend“) aus mod. Mefp-3 und mod. DP1A-Variante im Verhältnis 1:4 einen positiven Effekt auf die Adhäsionseigenschaften ( $0,63 \pm 0,15$  MPa). Durch Erhöhung des adhäsiven Anteils (mod. Mefp-3) im „Blend“ im Verhältnis 1:2 konnten im Mittel  $1,01 \pm 0,27$  MPa bestimmt werden. Insgesamt konnten die Klebeeigenschaften der mod. DP1A-Variante durch Zugabe von mod. Mefp-3 an die SiO<sub>2</sub>-OF verstärkt werden. Auch die Bruchbildbeurteilung zeigte, dass sich der Bruch von einem Adhäsionsbruch (mod. DP1A-Variante) zum Kohäsionsbruch im „Blend“ änderte (Kap. 3.3.3, Abb. 3-32, S. 110). Bei einem Kohäsionsbruch im Klebstoff sind alle Fügeteiloberflächen nach dem Bruch noch mit Klebstoff bzw. Klebstoffresten bedeckt. Der Kohäsionsbruch wird bei klebstoff-typischen Festigkeitswerten als qualitativ hochwertige Klebung gewertet. Die Bruchbildbeurteilung bestätigte somit, dass das Proteingemisch eine bessere Haftung an die SiO<sub>2</sub>-OF aufwies im Vergleich zur mod. DP1A-Variante (Adhäsionsbruch). Auch in der Natur besteht der Proteinkleber von Muscheln aus einem Gemisch unterschiedlicher Mfp, die sowohl adhäsive Eigenschaften durch die Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA wie in Mfp-3 und Mfp-5 zeigen, als auch kohäsive Eigenschaften durch Kollagen-ähnliche Sequenzanteile wie in Mfp-1 (Kap. 1.4.1.1, S. 12). Der positive Effekt eines Proteingemischs konnte somit auch für rekombinant produzierte Mfp in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden.

Im Allgemeinen geht aus den Ergebnissen der Zug-Scher-Versuche hervor, dass bei den hydroxylierten Proteinvarianten größere Standardabweichungen auftraten. Unter der Annahme heterogener Hydroxylierungsmuster, die durch die Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA mit His<sub>6</sub>-mTyr generiert werden, ist dieses Phänomen nicht überraschend. Mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse konnte beispielsweise für mod. Mefp-3 ein Proteingemisch aus 1 – 10 OH-Gruppen nachgewiesen werden (Kap. 3.2.2.3.2, S. 65). Ähnliche Heterogenität ist auch für die DP1A-Variante zu erwarten. Demzufolge sind die höheren SD bei den Messungen der mod. Proteinvarianten eher auf die biologische Varianz (unterschiedliche Anzahl an Hydroxylierungen) als auf technische Fehler bei der Vorbereitung und Konditionierung der Prüfkörper zurückzuführen. In Untersuchungen der nativen Mfp wurde ebenfalls gezeigt, dass nicht alle Tyr einer Proteinvariante pro Molekül hydroxyliert (DOPA) vorliegen [Waite, 1983b; Waite, 1985]. Bereits die einzigartige Aminosäuresequenz verleiht den Mfp ihre besonderen Bindeeigenschaften, die durch die Modifikation der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA verstärkt werden [Degen et al., 2021].

Tabelle 4-4 Literaturvergleich zu den Zug-Scher-Kräften Mfp- und ELP-basierter Sequenzen

Protein-Block	Proteinmenge	Konditionierung	Prüfparameter	OF	$\sigma$ (MPa)	Literatur
<b>Mfp-basierte Sequenzen</b>						
Mfp-151	20 mg	22 – 25 °C, 12 h	10 mm/min, 500 N Kraftzelle	PMMA	1,80	[Hwang et al., 2007]
Mfp-353	62,5 mg + 125 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	45 °C, 6 h (+ 300 g Gewichte)	10 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Haut (Kuh)	0,52	[Gim et al., 2008]
Mfp-151 Mod. Mfp-151	40 mg + 75 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	I) RT, 1 h II) 45 °C, 22 h III) RT, 1 h	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	0,33 0,40 – 0,86	[Cha et al., 2009]
Mgfp-3 Mod. Mgfp-3 Mod. Mgfp-5 Mod. Mfp-131 Mod. Mfp-151	(?) Proteinpuder + 10 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,5)	37 °C, 4 h	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	0,57 $\pm$ 0,21 0,94 $\pm$ 0,33 0,69 $\pm$ 0,17 1,64 $\pm$ 0,22 1,31 $\pm$ 0,11	[Yang et al., 2013]
Mfp-151 coMfp-151	31 mg + 125 $\mu$ L 5 % HAc	37°C, 3 h	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	0,80 $\pm$ 0,20 3,01 $\pm$ 0,62	[Choi et al., 2012]
Mgfp-3B coMgfp-3B	5 mg + 10 $\mu$ L 5 % HAc	37°C, 3 h	2 mm/min, 0,1 N Kraftzelle	Al	0,09 $\pm$ 0,01 0,26 $\pm$ 0,01	[Yao et al., 2022]
<b>ELP-basierte Sequenzen</b>						
ELY <sub>16</sub> Mod. ELY <sub>16</sub>	10 $\mu$ L Proteinlösung (150 mg/mL in H <sub>2</sub> O)	37°C, 24 h (+ 55 g Gewichte)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	2,60 $\pm$ 0,60 2,10 $\pm$ 0,50	[Brennan et al., 2017]
YKV <sub>48</sub> Mod. YKV <sub>48</sub>	10 $\mu$ L Proteinlösung (10% (w/v) in H <sub>2</sub> O)	37 °C, 24 h (+ 50 g Gewichte)	2 mm/min,	Haut (Schwein)	0,0043 0,011	[Hollingshead et al., 2022]
TE	20 mg + 40 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,0)	Kap. 2.2.7.2 (S. 50)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	SiO <sub>2</sub>	0,33 $\pm$ 0,07	vorliegende Arbeit
<b>Adhäsive Einzeldomäne</b>						vorliegende Arbeit
Mefp-3	20 mg + 40 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,0)	Kap. 2.2.7.2 (S. 50)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	SiO <sub>2</sub> Al	0,95 $\pm$ 0,07 0,68 $\pm$ 0,05	
Mod. Mefp-3*	20 mg + 20 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,0)			SiO <sub>2</sub> Al	1,68 $\pm$ 0,13 1,39 $\pm$ 0,22	
<b>Kombination aus adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken</b>						vorliegende Arbeit
DP1A-Var. Mod. DP1A- Var.*	20 mg + 40 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,0)	Kap. 2.2.7.2 (S. 50)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	SiO <sub>2</sub> SiO <sub>2</sub>	0,19 $\pm$ 0,12 0,53 $\pm$ 0,06	

Protein-Block	Proteinmenge	Konditionierung	Prüfparameter	OF	$\sigma$ (MPa)	Literatur
„Blend“	15 mg mod. DP1A-Var. + 5 mg mod. Mefp-3 + 40 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,0)	Kap. 2.2.7.2 (S. 50)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	SiO <sub>2</sub>	0,63 $\pm$ 0,15	
DP1B-Var.	20 mg + 40 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,0)	Kap. 2.2.7.2 (S. 50)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	SiO <sub>2</sub>	0,05 $\pm$ 0,01	
<b>Positivkontrolle</b>						
Fibrin	20 mg	22 – 25 °C, 12 h	10 mm/min, 500 N Kraftzelle	PMMA	0,30	[Hwang et al., 2007]
	62,5 mg + 125 $\mu$ L H <sub>2</sub> O	45 °C, 6 h (+ 300 g Gewichte)	10 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Haut (Kuh)	0,24	[Gim et al., 2008]
Fibrin	10 $\mu$ L Proteinlösung (150 mg/mL in H <sub>2</sub> O)	37°C, 24 h (+ 55 g Gewichte)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	0,70 $\pm$ 0,30	[Brennan et al., 2017]
Elmers Glue	40 mg	I) RT, 1 h II) 45 °C, 22 h III) RT, 1 h	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	0,17	[Cha et al., 2009]
	45 $\mu$ L	37°C, 24 h	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al Stahl	3,00 $\pm$ 1,00 1,60 $\pm$ 0,60	[Jenkins et al., 2017]
	50 $\mu$ L	Kap. 2.2.7.2 (S. 50)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	SiO <sub>2</sub> Al	1,29 $\pm$ 0,17 1,46 $\pm$ 0,46	vorliegende Arbeit
<b>Negativkontrolle</b>						
BSA	Proteinpuder (?) + 10 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,5)	37 °C, 4 h	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	0,10 $\pm$ 0,90	[Yang et al., 2013]
	10 $\mu$ L Proteinlösung (150 mg/mL in H <sub>2</sub> O)	37°C, 24 h (+ 55 g Gewichte)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	Al	0,07 $\pm$ 0,10	[Brennan et al., 2017]
	20 mg + 40 $\mu$ L 50 mM NaAc (pH 5,0)	Kap. 2.2.7.2 (S. 50)	2 mm/min, 2 kN Kraftzelle	SiO <sub>2</sub> Al	0,87 $\pm$ 0,19 0,00 $\pm$ 0,00	vorliegende Arbeit

$\sigma$  – Zug-Scher-Festigkeit, OF – Oberfläche, Al – Aluminium, RT – Raumtemperatur, mod. – Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA mittels Pilz-Tyrosinase, mod.\* – Modifikation Peptid-gebundener Tyr zu DOPA mittels mikrobieller Tyrosinase, coMfp-151 – *In vivo* Modifikation von Mfp-151 durch Co-Expression der Tyrosinase in *E. coli*, PMMA – Polymethylmethacrylat

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines Formaldehyd-freien biobasierten Proteinklebers für die Bindung von Sand, bestehend aus  $\text{SiO}_2$ . Viele natürliche Materialien sind trotz intensiver Forschung den, vom Mensch entwickelten, synthetischen Stoffen überlegen. Diese Biomaterialien entwickelten sich evolutionär über Jahrtausende, um spezifische Funktionen zu erfüllen. Auf der Suche nach leistungsfähigeren Materialien werden häufig von der Natur hervorgebrachte Strukturen adaptiert und optimiert. Für adhäsive Materialien sind die natürlichen Biopolymere der Miesmuschel der Gattung *Mytilus* sehr gut untersuchte Beispiele. Aus detaillierten Untersuchungen nativer Muschelfußproteine (Mfp) geht hervor, dass die einzigartigen Bindeeigenschaften der Muschel auf die post-translationale Modifikation von Peptid-gebundenem Tyrosin zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) zurückzuführen sind. Basierend auf den Strukturmerkmalen der Mfp wurde in der vorliegenden Arbeit das Mfp-3 als zentraler adhäsiver Protein-Block für die Designer-Proteine (DP) untersucht. Für die Entwicklung eines Klebstoffs sind neben den adhäsiven auch kohäsive Anteile essentiell. Während adhäsive Blöcke für die Haftung an eine Oberfläche sorgen, geben kohäsive Blöcke dem Kleber seine innere Festigkeit. Es wurde eine Mfp-3-basierte Fusions-Bibliothek entwickelt, die neben adhäsiven und kohäsiven Protein-Blöcken auch Linker-Sequenzen und Protein-tags zur Reinigung oder Detektion ausgewählter DP enthält. Als kohäsive Blöcke wurden Elastin-ähnliche Sequenzen (ELP) und Tropoelastin (TE) ausgewählt, da ein Protokoll zur rekombinanten Produktion beider Proteine etabliert war und die einzigartigen kohäsiven Eigenschaften durch einen temperaturinduzierten sequenzspezifischen Übergang von einer unstrukturierten Anordnung (*random-coil*) bei Raumtemperatur zu geordneten intra- und intermolekularen  $\beta$ -Helix-Strukturen für ELP-Sequenzen bereits gezeigt wurden. Für TE war diese Eigenschaft noch nicht beschrieben.

Die DP sowie die adhäsiven Einzelblöcke wurden rekombinant in *E. coli* im Bioreaktor-Maßstab hergestellt. Insgesamt wurden drei DP, zwei adhäsive Blöcke und zwei Hilfsenzyme produziert. Es folgte die Etablierung der Reinigung der Proteine aus der *E. coli* Biofeuchtmasse. Dafür wurden je nach Zielprotein verschiedene Ansätze getestet: Chromatografie, *Inverse transition cycling* (ITC) und Extraktion. Die zusammenfassende Übersicht mit den Ausbeuten zur heterologen Produktion und Aufarbeitung der DP ist Tabelle 5-1 (S. 147) zu entnehmen. Die adhäsive Einzeldomäne Mefp-3 aus *Mytilus edulis* sowie die Mefp3-basierten DP wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals rekombinant produziert. Bei der Produktion der Mefp3-basierten Fusionsproteine mit ELP-Blöcken, DP1A und DP1B, kam es jedoch zum partiellen Abbau der Zielproteine. Die Proteintermini der DP1A-Variante konnten mittels Edman-Sequenzierung (N-Terminus) und ISD/T3-Sequenzierung (C-Terminus) eindeutig bestimmt werden. Die Schnittstellen lagen zwischen zwei basischen Aminosäuren in der Mfp-3-Sequenz. Trotz diverser Ansätze zur Vermeidung der Fragmentierung von DP1A/B konnte der Abbau nicht unterbunden werden. Basierend auf den Sequenzierungsergebnissen enthielten die verkürzten DP1-Varianten jedoch modifizierbare Mfp-3-Sequenzanteile und die Grundidee zum Protein-Design eines Bindemittels aus adhäsiven und kohäsiven Anteilen blieb erhalten. Zudem war aus der Literatur bekannt, dass auch kurze Mfp-Sequenzen adhäsive Eigenschaften zeigen können. Zusammenfassend wurde die resultierende verkürzte DP1A/B-Variante mit Hilfe des ITC-Verfahrens zur Homogenität und einer Ausbeute von  $\sim 70 \text{ mg/L}_{\text{Kultur}}$  gereinigt (Tabelle 5-1, S. 147).

Zur Funktionalisierung der Peptid-gebundenen Tyrosine zu DOPA in den DP wurde eine mikrobielle Tyrosinase aus *V. spinosum* rekombinant in *E. coli* synthetisiert und

chromatographisch aufgereinigt (Reinheit > 95 %). Die Aktivitätsmessungen zeigten unter den getesteten Bedingungen mit L-Tyr als Substrat eine höhere spezifische Aktivität (bis zu 130-fach) im Vergleich zur kommerziell erhältlichen Pilz-Tyrosinase (Sigma). Die Hydroxylierung der DP wurde sowohl qualitativ mit der NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)-Färbung als auch quantitativ mittels MALDI-TOF/TOF untersucht. Die Analysen zeigten eine erfolgreiche Modifikation der Peptid-gebundenen Tyrosinreste zu DOPA. Darüber hinaus konnte für Mefp-3 modifiziert mit mikrobieller Tyrosinase erstmals eine Spezies mit einem Hydroxylierungsgrad von 100 % nachgewiesen werden. Auch die Tyr in den Mefp-3-Sequenzanteilen in der verkürzten DP1A-Variante wurden erfolgreich zu DOPA hydroxyliert. Zusätzlich bestätigte die ISD/T3-Analyse von mod. Mefp-3 sowie der DP1A-Variante, dass es zudem zur Ausbildung von TOPA (3,4,5-Trihydroxyphenylalanin) kam. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass DOPA in Muschelpeptiden durch die Pilz-Tyrosinase (Sigma) enzymatisch zu TOPA hydroxyliert werden konnte. Für mTyr aus *V. spinosum* war dies bislang nicht bekannt.

Ein Schwerpunkt der vorgelegten Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der rekombinanten DP mittels nano Differential-Scanning-Fluorimetrie (nanoDSF) und Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsüberwachung (QCM-D), sowie die Bestimmung der Zug-Scher-Eigenschaften an einer Universalprüfmaschine. Die QCM-D-Ergebnisse bestätigten die Grundidee des Protein-Designs und die Arbeitshypothese der vorgelegten Arbeit. Adhäsive Blöcke ermöglichen die Haftung an die SiO<sub>2</sub>-OF (Hauptbestandteil von Sand als Zielmaterial für den Protein-basierten Klebstoff), während die kohäsiven Blöcke zur inneren Festigkeit und Stabilität beitragen. Die Untersuchungen zeigten deutlich, dass die Kombination in der DP1A-Variante (~ 240 Hz) zu einer verbesserten Adsorption im Vergleich zu den adhäsiven Mfp-3-Einzelblöcken (~ 25 Hz) führte und somit die Adsorption um den Faktor 9,6 erhöht werden konnte. Zusätzlich konnte ein positiver Effekt auf die Bindung an die hydrophilen SiO<sub>2</sub>-Sensoren durch die Hydroxylierung der Peptid-gebundenen Tyrosine aller getesteten DP zu DOPA bestätigt werden. Bislang sind keine QCM-D-Daten zur Untersuchung der Adsorptionseigenschaften Mfp-basierter Sequenzen an SiO<sub>2</sub>-OF in der Literatur beschrieben.

Die DP (DP1A/B-Varianten) zeigten die geringsten Bindungskräfte der untersuchten Proteine an SiO<sub>2</sub>-OF (0,05 – 0,19 MPa). Die Hydroxylierung der Tyrosin-enthaltenden Sequenzen in DP1A resultierte in einer 2,8-fachen Steigerung der Klebkraft (0,53 ± 0,06 MPa). Anhand der Bruchbildbeurteilung kam es jedoch bei den Prüfkörpern zum Adhäsionsbruch (Bruch an der Haftungsoberfläche zwischen Klebstoff und Füge teil). Folglich waren die Sequenzanteile, die für die Adhäsion des Proteinklebers an die Zieloberfläche verantwortlich sind, in diesen DP zu gering und Kohäsionskräfte waren vorherrschend. Diese These wurde durch die Zugabe von mod. Mefp-3 zur mod. DP1A-Variante in einem Proteingemisch („Blend“) bestätigt. Die zusätzlichen adhäsiven Anteile zeigten einen positiven Effekt auf die Adhäsionseigenschaften. Besonders vielversprechende Resultate konnten für das rekombinante Mefp-3 generiert werden. Parallel zur SiO<sub>2</sub>-OF wurde die Klebkraft an Aluminium (Al) untersucht, da in der Literatur zur Untersuchung adhäsiver Proteine (z.B. Mfp, PC1, CP19) bislang hauptsächlich Füge teile aus Al verklebt wurden und um die Daten besser vergleichen zu können. Das hochgradig hydroxylierte mod. Mefp-3 zeigte unabhängig von der Oberfläche mit ~ 1,68 MPa (SiO<sub>2</sub>) und ~ 1,39 MPa (Al) ähnlich starke Zug-Scher-Kräfte wie ein kommerzieller Klebstoff (Elmers Glue, ~ 1,29 MPa an SiO<sub>2</sub> und ~ 1,46 MPa an Al). Basierend auf diesen Erkenntnissen war die Auswahl von Mfp-3 als zentraler adhäsiver Block im Baukastensystem eines proteinogenen Bindemittels gerechtfertigt. Sicherlich werden Proteine marinen Ursprungs auch bei der Entwicklung künftiger bio-basierter Materialien insbesondere mit der Funktionalisierung zu DOPA eine wesentliche Rolle spielen.

**Tabelle 5-1 Übersichtstabelle zur Produktion der Designer-Proteine und der mikrobiellen Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) als Werkzeugenzym, sowie deren Reinigung aus *E. coli* und Bestimmung der materialwissenschaftlichen Eigenschaften mittels QCM-D und Zwick**

Kategorie	Protein	Heterologe Produktion		Reinigung			Modifikation	Bindeeigenschaften	
		<i>E. coli</i> Produktionsstamm	Ausbeute (mg/L <sub>Kultur</sub> )	Reinigung	Ausbeute mg <sub>Protein</sub> /g <sub>BFM</sub>	Ausbeute nach His <sub>6</sub> -SUMO-Abspaltung mg <sub>Mfp-3</sub> /mg <sub>Fusionsprotein</sub>	Qualitativer Nachweis von DOPA	$\Delta f$ (Hz)	$\sigma$ (MPa)
<b>Adhäsive Einzel-domänen</b>	Mefp-3	BL21 (DE3) Gold pLysS	250 (Fusion)	IMAC	2,35 (Fusion)	0,22	X	58,2 ± 4,6	0,95 ± 0,07
	mod. Mefp-3						✓*	70,8 ± 8,8	1,68 ± 0,13
	Mgfp-3	BL21 (DE3) Gold pLysS	460 (Fusion)	IMAC	4,2 (Fusion)	0,22	X	12,5 ± 6,6	n.d.
	mod. Mgfp-3						✓	23,0 ± 4,1	n.d.
<b>Designer-Protein</b>	DP1A-Variante	BW3110	71	ITC	0,57		X	233,2 ± 6,9	0,19 ± 0,12
	mod. DP1A-Variante						✓*	298,0 ± 21,9	0,53 ± 0,06
	DP1B-Variante	BW3110	69	ITC	0,55		X	n.d.	0,05 ± 0,01
	mod. DP1B-Variante						✓	n.d.	n.d.
	DP2	BL21 (DE3) Gold pLysS	36	ITC	0,59		X	41,0 ± 5,3	n.d.
	mod. DP2						✓*	101,3 ± 18,0	n.d.
<b>Werkzeugenzym</b>	His <sub>6</sub> -mTyr	KRX	248	IMAC	21		X		

\* Neben dem qualitativer Nachweis von DOPA (NBT-Färbung) erfolgte ein quantitativer Nachweis mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse

## 6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass bio-inspirierte Polymere auf Proteinbasis vielversprechende Resultate zur Nutzung als Bindemittel für SiO<sub>2</sub>-Oberflächen liefern. Bereits mit dem Muschelfußprotein-3 aus *Mytilus edulis* (Mefp-3) konnten sehr gute Zug-Scher-Kräfte an einer Materialprüfmaschine im Vergleich zu einem kommerziellen Klebstoff bestimmt werden. Darüber hinaus zeigte die Kombination aus Mefp-3 und einem ELP (Elastin-ähnliches Polypeptid), welches zur inneren Festigkeit des Klebers (Kohäsion) beitragen sollte, in Designer-Protein 1 die beste Performance in den QCM-D-Analysen (Quarzkristall-Mikrowaage mit Dissipationsmonitor). Aus der umfangreichen Literatur-recherche gingen noch andere interessante native Proteindomänen hervor, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnten. Die Studien zeigten, dass natürliche Klebstoffe wie beispielsweise die des Frosches *Notaden bennetti* und des Sandburgenwurms *Phragmatopoma californica* Aminosäurezusammensetzungen besitzen, die nicht nur Elastin, sondern auch anderen Strukturproteinen wie Resilin und Seide ähneln und somit den Organismen selbst bzw. deren Biopolymeren ihre einzigartigen Bindeeigenschaften verleihen. Mögliche künftige Arbeiten könnten die Unterschiede in der Klebkraft zwischen diesen Proteinen untersuchen, um die Effekte der Proteinhydrophobizität und der spezifischen Sekundärstruktur (Struktur-Wirkungsbeziehungen) zu analysieren. Im Gesamtprojekt, in dem die vorliegende Arbeit eingebettet war, konnten bereits Designer-Proteine (DP) mit Resilin-ähnlichen Polypeptiden (RLP) und Seiden-ähnlichen Polypeptiden (SLP) rekombinant synthetisiert werden. Die Reinigung und biochemische Charakterisierung dieser DP mit Fokus auf deren funktionalen Eigenschaften wäre zum Vergleich der in dieser Arbeit untersuchten DP von großem Interesse. Schließlich könnte das vorgestellte modulare Protein-Engineering auf weitere Anwendungsbereiche wie zur Herstellung von Hydrogelen oder Wundkleber ausgeweitet werden.

L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) gilt als das Schlüsselmolekül der Adhäsion mariner Organismen und ermöglicht die Bindung an vielfältige Oberflächenstrukturen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergaben sich interessante Fragestellungen hinsichtlich der Hydroxylierung Peptid-gebundener Tyr zu DOPA, die zukünftig weiter untersucht werden sollten. Zum einen konnten mit der Nutzung der mikrobiell hergestellten Tyrosinase (His<sub>6</sub>-mTyr) Proteinspezies mit einem maximalen Hydroxylierungsgrad von 100 % nachgewiesen werden. Zur Optimierung der Enzymreaktion könnte der Progress des Hydroxylierungsgrades zeitaufgelöst verfolgt werden, um die Dauer der Reaktion und die Spezifität im Bezug auf die Position der Hydroxylierungen in der Proteinsequenz besser zu charakterisieren. Dabei wäre auch die detailliertere Analyse zur Ausbildung von 3,4,5-Trihydroxyphenylalanin (TOPA) von Bedeutung. Darüber hinaus könnten vergleichende Untersuchungen mit quantitativer MS-basierter Bestimmung von DOPA zwischen His<sub>6</sub>-mTyr und der kommerziell erhältlichen Pilz-Tyrosinase zur Modifikation in Mfp-enthaltenen Sequenzen durchgeführt werden. Neben dem Hydroxylierungsgrad wäre auch der Vergleich der modifizierten Positionen in der Polypeptidkette interessant. Aus der Literatur geht hervor, dass die Pilz-Tyrosinase nur ~ 40 % der Tyr zu DOPA hydroxyliert ohne weitere Informationen zur Lokalisation. In der vorliegenden Arbeit konnte bereits beim Vergleich beider Enzyme *in vitro* eine deutlich höhere spezifische Aktivität der His<sub>6</sub>-mTyr nachgewiesen werden. Zusätzlich würde eine HPLC-Analyse detailliertere Einblicke zur Quantifizierung von DOPA unabhängig der verwendeten Tyrosinase in den DP geben.

Die Untersuchung der Proteinadsorption unter Verwendung der QCM-D hat gezeigt, dass dieses System sehr gut geeignet ist, um die Grundidee zum Design eines Bindemittels auf

Proteinbasis unter Verwendung von geringen Mengen an Protein abzubilden. Neben der Messung des Adsorptionsverhaltens der produzierten DP an SiO<sub>2</sub>-Oberflächen mittels QCM-D bieten verschiedene materialwissenschaftliche Methoden eine Vielzahl an Möglichkeiten zur weiteren Analyse der Adhäsionszone und der ausgebildeten Proteinschichten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bearbeitet werden konnten. Zum einen könnte mit der Rasterkraft-Mikroskopie aufgeklärt werden, ob die DP gleichmäßig abgelagert sind oder es lokal zu stärkeren Interaktionen kam. Mittels Ellipsometrie könnte die Schichtdicke der ausgebildeten Proteinschichten bestimmt werden. Auch rheologische Untersuchungen zur Messung der viskoelastischen Eigenschaften (wie Fließ- und Deformationsverhalten) könnten zusätzliche interessante Einblicke hinsichtlich des Oberflächenbenetzungsverhaltens des Protein-basierenden Klebstoffs geben.

Ein weiterer Aspekt zur besseren Charakterisierung der DP als neuartige Bindemittel sind die mechanischen Eigenschaften im Hinblick auf die chemische und physikalische Vernetzung (z. B. durch Oxidation oder Chelatbildung mit Übergangsmetallen) der DOPA Gruppen in der Polypeptidkette. Die mechanischen Eigenschaften könnten durch die zusätzliche Vernetzung moduliert werden, da auch die inverse Übergangstemperatur der Proteine beeinflusst wird. Dadurch könnte man auch den Einfluss der Vernetzung auf die Konditionierung der Prüfkörper testen und so eventuell ein Feintuning während des Prozesses in der Klebefuge ermöglichen. Durch die stetig wachsende Bedeutung bio-basierter Bindemittel ist eine effiziente Produktion alternativer Materialien von gesteigertem Interesse für Forschung und Industrie. Zum einen kann die Expressionsleistung klassisch durch einen Stammwechsel, ein anderes Expressionssystem oder durch Anpassung der Kultivierungsbedingungen (wie Medium, Temperatur, Prozessdauer) optimiert werden. Zur Gewinnung der artifiziellen DP bleibt darüber hinaus die Synthese in zellfreien Systemen (CFPS engl. *cell-free protein synthesis*) eine vielversprechende Alternative, um die Kapazitäten natürlicher biologischer Systeme zu erweitern. Im Vergleich zum Zell-basierten Ansatz bietet die CFPS Vorteile wie kürzere Prozesszeiten und eine Expression von zytotoxischen Proteinen, die in lebenden Zellen nicht produziert werden können. Darüber hinaus könnten nicht-kanonische Aminosäuren (wie DOPA) während der zellfreien Synthese eingefügt werden, die beispielsweise bei einer *in vivo* Modifikation in *E. coli* ein verlangsamtes Zellwachstum und dadurch längere Prozesszeiten verursachen. Ergänzend zu den gezeigten Ergebnissen zur klassischen rekombinanten Produktion in der vorliegenden Arbeit, wurde der zellfreie Ansatz für die Synthese von DP1A untersucht. Jedoch waren die Syntheseausbeuten in den ersten Versuchen bislang sehr gering. Für die Anwendung als alternatives Produktionssystem ist eine Optimierung durch Anpassung der Reaktionstemperatur sowie Dauer der Synthese notwendig. Zudem bietet sich das „*Continuous-Exchange Cell-Free*“ Verfahren (CECF) an, um höhere Proteinausbeuten zu generieren. Für ein globuläres Protein konnten dabei bereits Proteinausbeuten im g/L-Maßstab erreicht werden. Damit liegt die Produktion rekombinanter Proteine mittels CECF im Bereich „*high yield*“ gängiger Zell-basierter Systeme und stellt eine aussichtsreiche Alternative dar.

## 7 Literatur

- Agunbiade, M. und Roes-Hill, L. (2022). "Application of bacterial tyrosinases in organic synthesis." *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **38**, 1-19.
- Akemi Ooka, A. und Garrell, R. L. (2000). "Surface-enhanced Raman spectroscopy of DOPA-containing peptides related to adhesive protein of marine mussel, *Mytilus edulis*." *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **57**, 92-102.
- Alvisi, N., Gutiérrez-Mejía, F. A., Lokker, M., Lin, Y.-T., De Jong, A. M., Van Delft, F. und De Vries, R. (2021). "Self-Assembly of Elastin-like Polypeptide Brushes on Silica Surfaces and Nanoparticles." *Biomacromolecules*, **22**, 1966-1979.
- Anderson, T. H., Yu, J., Estrada, A., Hammer, M. U., Waite, J. H. und Israelachvili, J. N. (2010). "The contribution of DOPA to substrate-peptide adhesion and internal cohesion of mussel-inspired synthetic peptide films." *Advanced Functional Materials*, **20**, 4196-4205.
- Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C. und Ponting, C. P. (2001). "Protein repeats: structures, functions, and evolution." *Journal of structural biology*, **134**, 117-131.
- Ausili, A., Berglin, M., Elwing, H., Corbalán-García, S. und Gómez-Fernández, J. C. (2012). "Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring and the real-time study of biological systems and macromolecules at interfaces." *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, **1**, 325-338.
- Axambayeva, A., Zhaparova, L., Shagyrova, Z. S., Ramankulov, E. und Shustov, A. (2018). "Unusual stability of a recombinant *Verrucomicrobium spinosum* tyrosinase to denaturing agents and its use for a production of a protein with adhesive properties." *Applied biochemistry and biotechnology*, **185**, 736-754.
- Ayyash, M. M., Sherkat, F. und Shah, N. P. (2013). "The effect of NaCl substitution with KCl on proteinase activities of cell-free extract and cell-free supernatant at different pH levels and salt concentrations: *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*." *Journal of dairy science*, **96**, 40-49.
- Bader, H.-J. (2015). "DIE KUNST DES KLEBENS." *Fonds der Chemischen Industrie im Verband der Chemischen Industrie e. V. (FCI)*.
- Baekeland, L. H. (1909). "The synthesis, constitution, and uses of Bakelite." *Industrial & Engineering Chemistry*, **1**, 149-161.
- Bailey, J. E. und Ollis, D. F. (2018). "Biochemical engineering fundamentals." McGraw-Hill.
- Baker, D. (2019). "What has de novo protein design taught us about protein folding and biophysics?" *Protein Science*, **28**, 678-683.
- Bakr, A. R. und Rahaman, M. S. (2016). "Electrochemical efficacy of a carboxylated multiwalled carbon nanotube filter for the removal of ibuprofen from aqueous solutions under acidic conditions." *Chemosphere*, **153**, 508-520.
- Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Current opinion in biotechnology*, **10**, 411-421.
- Baneyx, F. und Georgiou, G. (1991). "Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: protease III degrades high-molecular-weight substrates in vivo." *Journal of bacteriology*, **173**, 2696-2703.
- Baneyx, F. und Mujacic, M. (2004). "Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*." *Nature biotechnology*, **22**, 1399-1408.
- BMUB. (2017). "Verordnung zur Einführung einer Ersatzbaustoffverordnung, zur Neufassung der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung und zur Änderung der Deponieverordnung und der Gewerbeabfallverordnung." §3, Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz, Bau und Reaktorsicherheit
- Bracalello, A., Santopietro, V., Vassalli, M., Marletta, G., Del Gaudio, R., Bochicchio, B. und Pepe, A. (2011). "Design and production of a chimeric resilin-, elastin-, and collagen-like engineered polypeptide." *Biomacromolecules*, **12**, 2957-2965.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Analytical biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brennan, M. J. (2015). "Design and characterization of biomimetic adhesive materials."

- Brennan, M. J., Kilbride, B. F., Wilker, J. J. und Liu, J. C. (2017). "A bioinspired elastin-based protein for a cytocompatible underwater adhesive." *Biomaterials*, **124**, 116-125.
- BRL. (1986). "BRL pUC host: E. coli DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup> competent cells." *Focus*, **8**, 9.
- Brown, R. E., Jarvis, K. L. und Hyland, K. J. (1989). "Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances." *Analytical biochemistry*, **180**, 136-139.
- Brubaker, C. E. und Messersmith, P. B. (2011). "Enzymatically degradable mussel-inspired adhesive hydrogel." *Biomacromolecules*, **12**, 4326-4334.
- Brungardt, J., Govind, R. und Trick, H. N. (2020). "A simplified method for producing laboratory grade recombinant TEV protease from E. coli." *Protein Expression and Purification*, **174**, 105662.
- Burzio, L. A. und Waite, J. H. (2000). "Cross-linking in adhesive quinoproteins: studies with model decapeptides." *Biochemistry*, **39**, 11147-11153.
- Burzio, L. A. und Waite, J. H. (2002). "The other Topa: formation of 3, 4, 5-trihydroxyphenylalanine in peptides." *Analytical biochemistry*, **306**, 108-114.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. und Mattern, M. R. (2005). "SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins." *Protein Expression and Purification*, **43**, 1-9.
- Calendar, R. und Berg, P. (1966). "The catalytic properties of tyrosyl ribonucleic acid synthetases from Escherichia coli and Bacillus subtilis." *Biochemistry*, **5**, 1690-1695.
- Callaway, E. (2020). "It will change everything": DeepMind's AI makes gigantic leap in solving protein structures." *Nature*.
- Carvalho, L., Magalhães, F. und Ferra, J. (2012). "Formaldehyde Emissions from Wood-Based Panels-Testing Methods and Industrial Perspectives." *Formaldehyde: Chemistry, Applications and Role in Polymerization*, 73-107.
- Castillo, J., Shanbhag, B. und He, L. (2017). "Comparison of natural extraction and recombinant mussel adhesive proteins approaches." In: *Food Bioactives*, Springer, 111-135.
- CEN. (2008). "DIN EN ISO 291: 2008-08-Kunststoffe: Normalklimat für Konditionierung und Prüfung." Beuth-Verlag, Berlin.
- Cha, H. J., Hwang, D. S. und Lim, S. (2008). "Development of bioadhesives from marine mussels." *Biotechnology journal*, **3**, 631-638.
- Cha, H. J., Hwang, D. S., Lim, S., White, J. D., Matos-Perez, C. R. und Wilker, J. J. (2009). "Bulk adhesive strength of recombinant hybrid mussel adhesive protein." *Biofouling*, **25**, 99-107.
- Chamrad, D. C., Koerting, G., Gobom, J., Thiele, H., Klose, J., Meyer, H. E. und Blueggel, M. (2003). "Interpretation of mass spectrometry data for high-throughput proteomics." *Analytical and bioanalytical chemistry*, **376**, 1014-1022.
- Chandrasekaran, N., Dimartino, S. und Fee, C. J. (2013). "Study of the adsorption of proteins on stainless steel surfaces using QCM-D." *Chemical Engineering Research and Design*, **91**, 1674-1683.
- Chattopadhyay, G. und Varadarajan, R. (2019). "Facile measurement of protein stability and folding kinetics using a nano differential scanning fluorimeter." *Protein Science*, **28**, 1127-1134.
- Chen, Q., Tang, W., Wang, D., Wu, X., Li, N. und Liu, F. (2010). "Amplified QCM-D biosensor for protein based on aptamer-functionalized gold nanoparticles." *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 575-579.
- Chen, X., Zaro, J. L. und Shen, W.-C. (2013). "Fusion protein linkers: property, design and functionality." *Advanced drug delivery reviews*, **65**, 1357-1369.
- Choi, B.-H., Cheong, H., Ahn, J.-S., Zhou, C., Kwon, J. J., Cha, H. J. und Jun, S. H. (2015). "Engineered mussel biogluce as a functional osteoinductive binder for grafting of bone substitute particles to accelerate in vivo bone regeneration." *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 546-555.
- Choi, J. H., Keum, K. C. und Lee, S. Y. (2006). "Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coli." *Chemical engineering science*, **61**, 876-885.
- Choi, Y. S., Yang, Y. J., Yang, B. und Cha, H. J. (2012). "In vivo modification of tyrosine residues in recombinant mussel adhesive protein by tyrosinase co-expression in Escherichia coli." *Microbial cell factories*, **11**, 1.

- Chou, P. Y. und Fasman, G. D. (1978). "Empirical predictions of protein conformation." *Annual review of biochemistry*, **47**, 251-276.
- Chow, D. C., Dreher, M. R., Trabbic-Carlson, K. und Chilkoti, A. (2006). "Ultra-high expression of a thermally responsive recombinant fusion protein in *E. coli*." *Biotechnology progress*, **22**, 638-646.
- Christensen, T., Amiram, M., Dagher, S., Trabbic-Carlson, K., Shamji, M. F., Setton, L. A. und Chilkoti, A. (2009). "Fusion order controls expression level and activity of elastin-like polypeptide fusion proteins." *Protein Science*, **18**, 1377-1387.
- Christjanson, P., Pehk, T. und Siimer, K. "Structure formation in urea-formaldehyde resin synthesis." *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences. Chemistry*, 212-225.
- Collins, T., Barroca, M. r., Branca, F., Padrão, J., Machado, R. und Casal, M. (2014). "High level biosynthesis of a silk-elastin-like protein in *E. coli*." *Biomacromolecules*, **15**, 2701-2708.
- Cooper, A. und Kennedy, M. W. (2010). "Biofoams and natural protein surfactants." *Biophysical chemistry*, **151**, 96-104.
- Cooper, A., Vance, S. J., Smith, B. O. und Kennedy, M. W. (2017). "Frog foams and natural protein surfactants." *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **534**, 120-129.
- Coover, J. H. W. und Shearer, J. N. H. (1957). "Adhesive compositions containing alkyl esters of cyanoacrylic acid." Google Patents.
- Costa, R. R., Custódio, C. A., Testera, A. M., Arias, F. J., Rodríguez-Cabello, J. C., Alves, N. M. und Mano, J. F. (2009). "Stimuli-responsive thin coatings using elastin-like polymers for biomedical applications." *Advanced Functional Materials*, **19**, 3210-3218.
- Coyle, B. L. und Baneyx, F. (2014). "A cleavable silica-binding affinity tag for rapid and inexpensive protein purification." *Biotechnology and bioengineering*, **111**, 2019-2026.
- Cui, C. und Liu, W. (2021). "Recent advances in wet adhesives: Adhesion mechanism, design principle and applications." *Progress in Polymer Science*, **116**, 101388.
- Dai, G., Hu, J., Zhao, X. und Wang, P. (2017). "A colorimetric paper sensor for lactate assay using a cellulose-Binding recombinant enzyme." *Sensors and Actuators B: Chemical*, **238**, 138-144.
- Dandu, R., Von Cresce, A., Briber, R., Dowell, P., Cappello, J. und Ghandehari, H. (2009). "Silk-elastinlike protein polymer hydrogels: Influence of monomer sequence on physicochemical properties." *Polymer*, **50**, 366-374.
- Deepankumar, K., George, A., Krishna Priya, G., Ilamaran, M., Kamini, N., Senthil, T., Easwaramoorthi, S. und Ayyadurai, N. (2017). "Next generation designed protein as a photosensitizer for biophotovoltaics prepared by expanding the genetic code." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **5**, 72-77.
- Degen, G. D., Cunha, K. C., Levine, Z. A., Waite, J. H. und Shea, J.-E. (2021). "Molecular Context of Dopa Influences Adhesion of Mussel-Inspired Peptides." *The Journal of Physical Chemistry B*, **125**, 9999-10008.
- Deming, T. J. (1999). "Mussel byssus and biomolecular materials." *Current opinion in chemical biology*, **3**, 100-105.
- Desai, M. S. und Lee, S. W. (2015). "Protein-based functional nanomaterial design for bioengineering applications." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **7**, 69-97.
- Desai, M. S., Wang, E., Joyner, K., Chung, T. W., Jin, H.-E. und Lee, S.-W. (2016). "Elastin-Based Rubber-Like Hydrogels." *Biomacromolecules*, **17**, 2409-2416.
- DIN, e. V. (2009). "DIN EN 1465:1995-01, Klebstoffe -Bestimmung der Zugscherfestigkeit von Überlappungsklebungen." Beuth Verlag, Berlin.
- DIN, e. V. (2017). "DIN EN 16516, Bauprodukte: Bewertung der Freisetzung gefährlicher Stoffe – Bestimmung von Emissionen in die Innenraumluft." Deutsches Institut für Normung e.V.
- Dinjaski, N. und Kaplan, D. L. (2016). "Recombinant protein blends: silk beyond natural design." *Current opinion in biotechnology*, **39**, 1-7.
- Do, H., Kang, E., Yang, B., Cha, H. J. und Choi, Y. S. (2017). "A tyrosinase, mTyr-CNK, that is functionally available as a monophenol monooxygenase." *Scientific reports*, **7**, 1-8.

- Dougherty, M. J. und Arnold, F. H. (2009). "Directed evolution: new parts and optimized function." *Current opinion in biotechnology*, **20**, 486-491.
- Down, J. L. (2015). "The evaluation of selected poly (vinyl acetate) and acrylic adhesives: A final research update." *Studies in conservation*, **60**, 33-54.
- Duckworth, H. W. und Coleman, J. E. (1970). "Physicochemical and kinetic properties of mushroom tyrosinase." *Journal of Biological Chemistry*, **245**, 1613-1625.
- ECHA, C. f. R. A. (2020). "Background Document." ECHA <https://echa.europa.eu/documents/10162/7c405b9b-1a8f-0844-5670-58e5deba05ad>.
- Edvardsson, M., Rodahl, M., Kasemo, B. und Höök, F. (2005). "A dual-frequency QCM-D setup operating at elevated oscillation amplitudes." *Analytical Chemistry*, **77**, 4918-4926.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A. und Smart, A. (2019). "The Pfam protein families database in 2019." *Nucleic acids research*, **47**, D427-D432.
- Endrizzi, B. J. und Stewart, R. J. (2009). "Glueomics: an expression survey of the adhesive gland of the sandcastle worm." *The Journal of Adhesion*, **85**, 546-559.
- Enfors, S.-O. und Haggström, L. (1994). "Bioprocess Technology." *Fundamentals and Applications. Royal Institute of Technology, Stockholm, Stockholm*.
- Espín, J. C., GARCÍA-RUIZ, P. A., TUDELA, J. und GARCÍA-CÁNOVAS, F. (1998). "Study of stereospecificity in mushroom tyrosinase." *Biochemical journal*, **331**, 547-551.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G. und Bishop, J. M. (1985). "Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product." *Molecular and cellular biology*, **5**, 3610-3616.
- Even, M. A., Wang, J. und Chen, Z. (2008). "Structural information of mussel adhesive protein Mefp-3 acquired at various polymer/Mefp-3 solution interfaces." *Langmuir*, **24**, 5795-5801.
- Faccio, G., Kruus, K., Saloheimo, M. und Thöny-Meyer, L. (2012). "Bacterial tyrosinases and their applications." *Process Biochemistry*, **47**, 1749-1760.
- Fairhead, M. und Thöny-Meyer, L. (2010). "Role of the C-terminal extension in a bacterial tyrosinase." *The FEBS journal*, **277**, 2083-2095.
- Falbe, J. (1997). "Römp-Lexikon Chemie. 3. H-L." Thieme.
- Fan, C., Ho, J. M., Chirathivat, N., Söll, D. und Wang, Y. S. (2014). "Exploring the Substrate Range of Wild-Type Aminoacyl-tRNA Synthetases." *ChemBioChem*, **15**, 1805-1809.
- Favi, P. M., Yi, S., Lenaghan, S. C., Xia, L. und Zhang, M. (2014). "Inspiration from the natural world: from bio-adhesives to bio-inspired adhesives." *Journal of Adhesion Science and Technology*, **28**, 290-319.
- Ferruz, N. und Höcker, B. (2022). "Towards Controllable Protein design with Conditional Transformers." *arXiv preprint arXiv:2201.07338*.
- Ferruz, N., Schmidt, S. und Höcker, B. (2022). "ProtGPT2 is a deep unsupervised language model for protein design." *Nature communications*, **13**, 1-10.
- Florioli, R. Y., von Langen, J. und Waite, J. H. (2000). "Marine surfaces and the expression of specific byssal adhesive protein variants in *Mytilus*." *Marine Biotechnology*, **2**, 352-363.
- Floss, D. M., Schallau, K., Rose-John, S., Conrad, U. und Scheller, J. (2010). "Elastin-like polypeptides revolutionize recombinant protein expression and their biomedical application." *Trends in biotechnology*, **28**, 37-45.
- Flurkey, A., Cooksey, J., Reddy, A., Spoonmore, K., Rescigno, A., Inlow, J. und Flurkey, W. H. (2008). "Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies." *Journal of agricultural and food chemistry*, **56**, 4760-4768.
- Foo, C. W. P. und Kaplan, D. L. (2002). "Genetic engineering of fibrous proteins: spider dragline silk and collagen." *Advanced drug delivery reviews*, **54**, 1131-1143.
- Forooshani, P. K., Meng, H. und Lee, B. P. (2017). "Catechol redox reaction: reactive oxygen species generation, regulation, and biomedical applications." In: *Advances in Bioinspired and Biomedical Materials Volume 1*, ACS Publications, 179-196.
- Garcia-Rivera, J. und Casadevall, A. (2001). "Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate." *Sabouraudia*, **39**, 353-357.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D. und Bairoch, A. (2005). "Protein identification and analysis tools on the ExPASy server." In: *The proteomics protocols handbook*, Springer, 571-607.
- Ge, X., Trabbic-Carlson, K., Chilkoti, A. und Filipe, C. D. (2006). "Purification of an elastin-like fusion protein by microfiltration." *Biotechnology and bioengineering*, **95**, 424-432.
- Gebbie, M. A., Wei, W., Schrader, A. M., Cristiani, T. R., Dobbs, H. A., Idso, M., Chmelka, B. F., Waite, J. H. und Israelachvili, J. N. (2017). "Tuning underwater adhesion with cation- $\pi$  interactions." *Nature chemistry*, **9**, 473-479.
- Genaxxon, b. (2015). "Protease Inhibitor Mix III für Bakterienextrakte." Genaxxon bioscience GmbH <https://www.genaxxon.com/shop-all-products/chemikalien/inhibitoren/5555/protease-inhibitor-mix-iii-fuer-bakterienextrakte>.
- Geng, J., Yu, S.-B., Wan, X., Wang, X.-J., Shen, P., Zhou, P. und Chen, X.-D. (2008). "Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system." *Journal of biochemical and biophysical methods*, **70**, 1151-1155.
- Gillespie, J. P., Bidochka, M. J. und Khachatourians, G. G. (1991). "Separation and characterization of grasshopper hemolymph phenoloxidases by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **98**, 351-358.
- Gim, Y., Hwang, D. S., Lim, S., Song, Y. H. und Cha, H. J. (2008). "Production of fusion mussel adhesive fp-353 in Escherichia coli." *Biotechnology progress*, **24**, 1272-1277.
- Girotti, A., Reguera, J., Arias, F. J., Alonso, M., Testera, A. M. und Rodríguez-Cabello, J. C. (2004). "Influence of the molecular weight on the inverse temperature transition of a model genetically engineered elastin-like pH-responsive polymer." *Macromolecules*, **37**, 3396-3400.
- Givens, B. E., Diklich, N. D., Fiegel, J. und Grassian, V. H. (2017). "Adsorption of bovine serum albumin on silicon dioxide nanoparticles: Impact of p H on nanoparticle-protein interactions." *Biointerphases*, **12**, 02D404.
- Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. und Riggs, A. D. (1979). "Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 106-110.
- Gottesman, S., Wickner, S. und Maurizi, M. R. (1997). "Protein quality control: triage by chaperones and proteases." *Genes & development*, **11**, 815-823.
- Gray, W. R., SANDBERG, L. B. und FOSTER, J. A. (1973). "Molecular model for elastin structure and function." *Nature*, **246**, 461-466.
- Griffith, L. G. und Naughton, G. (2002). "Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities." *science*, **295**, 1009-1014.
- Guerette, P. A., Hoon, S., Seow, Y., Raida, M., Masic, A., Wong, F. T., Ho, V. H., Kong, K. W., Demirel, M. C. und Pena-Francesch, A. (2013). "Accelerating the design of biomimetic materials by integrating RNA-seq with proteomics and materials science." *Nature biotechnology*, **31**, 908.
- Guo, N., You, X., Wu, Y., Du, D., Zhang, L., Shang, Q. und Liu, W. (2020). "Continuous fluorometric method for determining the monophenolase activity of tyrosinase on L-tyrosine, through quenching L-DOPA fluorescence by borate." *Analytical chemistry*, **92**, 5780-5786.
- Gutteridge, S., Dickson, G. und Robb, D. (1977). "Photochemical oxidation of tyrosinase." *Phytochemistry*, **16**, 517-519.
- Habenicht, G. (2009). "Kleben der Kunststoffe und weiterer nichtmetallischer Werkstoffe." *Kleben: Grundlagen, Technologien, Anwendungen*, 645-737.
- Haider, M., Leung, V., Ferrari, F., Crissman, J., Powell, J., Cappello, J. und Ghandehari, H. (2005). "Molecular engineering of silk-elastinlike polymers for matrix-mediated gene delivery: biosynthesis and characterization." *Molecular pharmaceuticals*, **2**, 139-150.
- Haneskog, L. (2006). "Purification of Histidine-Tagged Proteins under Denaturing Conditions Using IMAC." *Cold Spring Harbor Protocols*, **2006**, pdb. prot4221.

- Harris, K. und Lafarge, P. (2006). "FENOTEC- Ester-hardened alkaline phenolic resin binders." *Giesserei-Praxis*, 194-200.
- Hartnett, J., Gracyalny, J. und Slater, M. R. (2006). "The single step (KRX) competent cells: efficient cloning and high protein yields." *Promega Notes*, **94**, 27-30.
- Hecht, M. H., Das, A., Go, A., Bradley, L. H. und Wei, Y. (2004). "De novo proteins from designed combinatorial libraries." *Protein Science*, **13**, 1711-1723.
- Heine, B. (2003). "Werkstoffprüfung." *Ermittlung von Werkstoffeigenschaften*, Hanser.
- Held, P. G. (2001). "Nucleic acid purity assessment using A260/A280 ratios." Available Source: [http://www.biotek.com/products/tech\\_res\\_detail.php](http://www.biotek.com/products/tech_res_detail.php).
- Helm, C. A., Knoll, W. und Israelachvili, J. N. (1991). "Measurement of ligand-receptor interactions." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **88**, 8169-8173.
- Hemmersam, A. G., Foss, M., Chevallier, J. und Besenbacher, F. (2005). "Adsorption of fibrinogen on tantalum oxide, titanium oxide and gold studied by the QCM-D technique." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **43**, 208-215.
- Hicks, M., Barber, A. und Babbitt, P. (2014). "Protein Families: Relating Protein Sequence, Structure, and Function."
- Högenauer, G., Kreil, G. und Bernheimer, H. (1978). "Studies on the binding of DOPA (3, 4-dihydroxyphenylalanine) to tRNA." *FEBS letters*, **88**, 101-104.
- Hollingshead, S., Torres, J. E., Wilker, J. J. und Liu, J. C. (2022). "Effect of Cross-Linkers on Mussel-and Elastin-Inspired Adhesives on Physiological Substrates." *ACS Applied Bio Materials*.
- Höök, F., Kasemo, B., Nylander, T., Fant, C., Sott, K. und Elwing, H. (2001). "Variations in coupled water, viscoelastic properties, and film thickness of a Mefp-1 protein film during adsorption and cross-linking: a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring, ellipsometry, and surface plasmon resonance study." *Analytical Chemistry*, **73**, 5796-5804.
- Huang, P.-S., Boyken, S. E. und Baker, D. (2016). "The coming of age of de novo protein design." *Nature*, **537**, 320-327.
- Huang, W., Ebrahimi, D., Dinjaski, N., Tarakanova, A., Buehler, M. J., Wong, J. Y. und Kaplan, D. L. (2017). "Synergistic integration of experimental and simulation approaches for the de novo design of silk-based materials." *Accounts of chemical research*, **50**, 866-876.
- Huang, W., Rollett, A. und Kaplan, D. L. (2015). "Silk-elastin-like protein biomaterials for the controlled delivery of therapeutics." *Expert opinion on drug delivery*, **12**, 779-791.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M.-S., Novotný, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E. und Crea, R. (1988). "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **85**, 5879-5883.
- Hwang, D. S., Choi, Y. S. und Cha, H. J. (2013). "Mussel-derived adhesive biomaterials." *Marine biomaterials*, 289-309.
- Hwang, D. S., Gim, Y. und Cha, H. J. (2005). "Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli*." *Biotechnology progress*, **21**, 965-970.
- Hwang, D. S., Gim, Y., Yoo, H. J. und Cha, H. J. (2007). "Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151." *Biomaterials*, **28**, 3560-3568.
- Hwang, D. S. und Waite, J. H. (2012). "Three intrinsically unstructured mussel adhesive proteins, mfp-1, mfp-2, and mfp-3: Analysis by circular dichroism." *Protein Science*, **21**, 1689-1695.
- Hwang, D. S., Yoo, H. J., Jun, J. H., Moon, W. K. und Cha, H. J. (2004). "Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgfp-5 in *Escherichia coli*." *Applied and environmental microbiology*, **70**, 3352-3359.
- Hwang, D. S., Zeng, H., Masic, A., Harrington, M. J., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2010). "Protein-and metal-dependent interactions of a prominent protein in mussel adhesive plaques." *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 25850-25858.
- Ilamaran, M., Sundarapandian, A., Aarthy, M., Shanmugam, G., Ponesakki, G., Ramudu, K. N. und Niraikulam, A. (2020). "Growth factor-mimicking 3, 4-dihydroxyphenylalanine-

- encoded bioartificial extracellular matrix like protein promotes wound closure and angiogenesis." *Biomaterials Science*, **8**, 6773-6785.
- Industrie, F. d. C. I. i. V. d. C. (2001). "Kleben/Klebstoffe (27)." Kleben/Klebstoffe, Fonds der Chemischen Industrie; Industrieverband Klebstoffe e.V.
- Inostroza-Brito, K. E., Collin, E., Siton-Mendelson, O., Smith, K. H., Monge-Marcet, A., Ferreira, D. S., Rodríguez, R. P., Alonso, M., Rodríguez-Cabello, J. C. und Reis, R. L. (2015). "Co-assembly, spatiotemporal control and morphogenesis of a hybrid protein-peptide system." *Nature chemistry*, **7**, 897.
- Inoue, K., Takeuchi, Y., Miki, D., Odo, S., Harayama, S. und Waite, J. H. (1996). "Cloning, sequencing and sites of expression of genes for the hydroxyarginine-containing adhesive-plaque protein of the mussel *Mytilus galloprovincialis*." *European Journal of Biochemistry*, **239**, 172-176.
- Iturri, J., Xue, L., Kappl, M., García-Fernández, L., Barnes, W. J. P., Butt, H. J. und del Campo, A. (2015). "Torrent Frog-Inspired Adhesives: Attachment to Flooded Surfaces." *Advanced Functional Materials*, **25**, 1499-1505.
- Jäckel, C., Kast, P. und Hilvert, D. (2008). "Protein design by directed evolution." *Annu. Rev. Biophys.*, **37**, 153-173.
- Jenkins, C. L., Siebert, H. M. und Wilker, J. J. (2017). "Integrating mussel chemistry into a bio-based polymer to create degradable adhesives." *Macromolecules*, **50**, 561-568.
- Jiang, X., Feng, T., An, B., Ren, S., Meng, J., Li, K., Liu, S., Wu, H., Zhang, H. und Zhong, C. (2022). "A Bi-Layer Hydrogel Cardiac Patch Made of Recombinant Functional Proteins." *Advanced Materials*, 2201411.
- Joseph, B. C., Pichaimuthu, S., Srimeenakshi, S., Murthy, M., Selvakumar, K., Ganesan, M. und Manjunath, S. R. (2015). "An overview of the parameters for recombinant protein expression in *Escherichia coli*." *Journal of Cell Science & Therapy*, **6**, 1.
- Kajava, A. V. (2012). "Tandem repeats in proteins: from sequence to structure." *Journal of structural biology*, **179**, 279-288.
- Kaletka, C., Schäuble, S., Rinas, U. und Schuster, S. (2013). "Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*." *Biotechnology journal*, **8**, 1105-1114.
- Kamino, K. (2013). "Mini-review: barnacle adhesives and adhesion." *Biofouling*, **29**, 735-749.
- Kan, Y., Danner, E. W., Israelachvili, J. N., Chen, Y. und Waite, J. H. (2014). "Boronate complex formation with Dopa containing mussel adhesive protein retards pH-induced oxidation and enables adhesion to mica." *PloS one*, **9**, e108869.
- Kanatani, A., Masuda, T., Shimoda, T., Misoka, F., Lin, X. S., Yoshimoto, T. und Tsuru, D. (1991). "Protease II from *Escherichia coli*: sequencing and expression of the enzyme gene and characterization of the expressed enzyme." *The Journal of Biochemistry*, **110**, 315-320.
- Kang, S.-g. und Saven, J. G. (2007). "Computational protein design: structure, function and combinatorial diversity." *Current opinion in chemical biology*, **11**, 329-334.
- Keimel, F. A. (2003). "Historical development of adhesives and adhesive bonding." *Handbook of adhesive Technology*, 1-12.
- Kim, E., Dai, B., Qiao, J. B., Li, W., Fortner, J. D. und Zhang, F. (2018). "Microbially synthesized repeats of mussel foot protein display enhanced underwater adhesion." *ACS applied materials & interfaces*, **10**, 43003-43012.
- Kim, E., Jeon, J., Zhu, Y., Hoppe, E. D., Jun, Y.-S., Genin, G. M. und Zhang, F. (2021). "A Biosynthetic Hybrid Spidroin-Amyloid-Mussel Foot Protein for Underwater Adhesion on Diverse Surfaces." *ACS Applied Materials & Interfaces*, **13**, 48457-48468.
- Kim, S.-O. und Lee, Y. I. (1996). "High-level expression and simple purification of recombinant human insulin-like growth factor I." *Journal of biotechnology*, **48**, 97-105.
- Kloeser, L., Kües, U., Schöpfer, C., Hosseinkhani, H., Schütze, S., Dantz, S., Malik, I., Vos, H., Bartholme, M. und Müller, C. (2007). "15. Panel Boards and Conventional Adhesives." *Wood Production, Wood Technology, and Biotechnological Impacts*, 297.
- Knappe, F., Dehoust, G., Petschow, U. und Jakubowski, G. (2012). "Steigerung von Akzeptanz und Einsatz mineralischer Sekundärrohstoffe unter Berücksichtigung schutzgutbezogener und anwendungsbezogener Anforderungen, des potenziellen,

- volkswirtschaftlichen Nutzens sowie branchenbezogener, ökonomischer Anreizinstrumente." *Dessau: UBA-Texte*.
- Kohn, J., Welsh, W. J. und Knight, D. (2007). "A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials." *Biomaterials*, **28**, 4171-4177.
- Kord Forooshani, P. und Lee, B. P. (2017). "Recent approaches in designing bioadhesive materials inspired by mussel adhesive protein." *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **55**, 9-33.
- Kortemme, T., Ramírez-Alvarado, M. und Serrano, L. (1998). "Design of a 20-amino acid, three-stranded  $\beta$ -sheet protein." *science*, **281**, 253-256.
- Kosmulski, M. (2016). "Isoelectric points and points of zero charge of metal (hydr) oxides: 50 years after Parks' review." *Advances in colloid and interface science*, **238**, 1-61.
- Krausch, N., Hans, S., Fiedler, F., Lucia, S., Neubauer, P. und Bournazou, M. N. C. (2020). "From screening to production: a holistic approach of high-throughput model-based screening for recombinant protein production." In: *Computer Aided Chemical Engineering*, Elsevier, 1723-1728, 48.
- Krug, D. und Tobisch, S. (2010). "Einsatz von Proteinen als Bindemittel für Holzwerkstoffe." *European Journal of Wood and Wood Products*, **68**, 289-301.
- Kuhlman, B. und Baker, D. (2000). "Native protein sequences are close to optimal for their structures." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 10383-10388.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. und Kornberg, A. (2001). "Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*." *Science*, **293**, 705-708.
- Ladisch, M. R. und Kohlmann, K. L. (1992). "Recombinant human insulin." *Biotechnology progress*, **8**, 469-478.
- Laemmli, U. (1970). "SDS-page Laemmli method." *Nature*, **227**, 680-5.
- Lee, B. P., Messersmith, P. B., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2011). "Mussel-inspired adhesives and coatings." *Annual review of materials research*, **41**, 99.
- Lee, H., Scherer, N. F. und Messersmith, P. B. (2006). "Single-molecule mechanics of mussel adhesion." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 12999-13003.
- Lee, I. und Suzuki, C. K. (2008). "Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease-lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, **1784**, 727-735.
- Lee, M.-H., Park, S.-K., Chung, C.-K. und Kim, H.-J. (2004). "QCM study of  $\beta$ -casein adsorption on the hydrophobic surface: effect of ionic strength and cations." *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **25**, 1031-1035.
- Lee, S.-W., Choi, B. I., Kim, J. C., Woo, S.-B. und Kim, Y.-G. (2020). "Reducing individual difference and temperature dependency of QCM humidity sensors based on graphene oxides through normalization of frequency shifts." *Sensors and Actuators B: Chemical*, **313**, 128043.
- Lee, S. Y., Lee, J. N., Chathuranga, K., Lee, J. S. und Park, W. H. (2021). "Tunicate-inspired polyallylamine-based hydrogels for wet adhesion: A comparative study of catechol-and gallol-functionalities." *Journal of Colloid and Interface Science*, **601**, 143-155.
- Lee, T. A. T., Cooper, A., Apkarian, R. P. und Conticello, V. P. (2000). "Thermo-Reversible Self-Assembly of Nanoparticles Derived from Elastin-Mimetic Polypeptides." *Advanced Materials*, **12**, 1105-1110.
- Li, L., Li, N. K., Tu, Q., Im, O., Mo, C.-K., Han, W., Fuss, W. H., Carroll, N. J., Chilkoti, A. und Yingling, Y. G. (2018). "Functional modification of silica through enhanced adsorption of elastin-like polypeptide block copolymers." *Biomacromolecules*, **19**, 298-306.
- Li, L. und Zeng, H. (2016). "Marine mussel adhesion and bio-inspired wet adhesives." *Biotribology*, **5**, 44-51.
- Li, Y., Cheng, J., Delparastan, P., Wang, H., Sigg, S. J., DeFrates, K. G., Cao, Y. und Messersmith, P. B. (2020). "Molecular design principles of Lysine-DOPA wet adhesion." *Nature communications*, **11**, 1-8.
- Li, Y., Liang, C., Gao, L., Li, S., Zhang, Y., Zhang, J. und Cao, Y. (2017). "Hidden complexity of synergistic roles of Dopa and lysine for strong wet adhesion." *Materials Chemistry Frontiers*, **1**, 2664-2668.

- Li, Y., Qin, M., Li, Y., Cao, Y. und Wang, W. (2014). "Single molecule evidence for the adaptive binding of DOPA to different wet surfaces." *Langmuir*, **30**, 4358-4366.
- Liang, C., Li, Y., Liu, Z., Wu, W. und Hu, B. (2015). "Protein Aggregation Formed by Recombinant cp19k Homologue of *Balanus albicostatus* Combined with an 18 kDa N-Terminus Encoded by pET-32a (+) Plasmid Having Adhesion Strength Comparable to Several Commercial Glues." *PloS one*, **10**, e0136493.
- Lin, C.-Y. und Liu, J. C. (2016). "Modular protein domains: an engineering approach toward functional biomaterials." *Current opinion in biotechnology*, **40**, 56-63.
- Liu, X., Liang, C., Zhang, X., Li, J., Huang, J., Zeng, L., Ye, Z., Hu, B. und Wu, W. (2017). "Amyloid fibril aggregation: An insight into the underwater adhesion of barnacle cement." *Biochemical and biophysical research communications*, **493**, 654-659.
- Lord, M., Cousins, B., Doherty, P., Whitelock, J., Simmons, A., Williams, R. und Milthorpe, B. (2006). "The effect of silica nanoparticulate coatings on serum protein adsorption and cellular response." *Biomaterials*, **27**, 4856-4862.
- Lottspeich, F. (2012). "Bioanalytik. 243–268." Springer-Verlag.
- Luan, C. H., Parker, T. M., Prasad, K. U. und Urry, D. W. (1991). "Differential scanning calorimetry studies of NaCl effect on the inverse temperature transition of some elastin-based polytetra-, poly-penta-, and polynona-peptides." *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **31**, 465-475.
- Luo, Q., Shen, Y.-L., Wei, D.-Z. und Cao, W. (2006). "Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high-cell-density culture by recombinant *Escherichia coli*." *Applied microbiology and biotechnology*, **71**, 184-191.
- MacEwan, S. R., Hassouneh, W. und Chilkoti, A. (2014). "Non-chromatographic purification of recombinant elastin-like polypeptides and their fusions with peptides and proteins from *Escherichia coli*." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, e51583.
- Machado, R., Azevedo-Silva, J., Correia, C., Collins, T., Arias, F. J., Rodríguez-Cabello, J. C. und Casal, M. (2013). "High level expression and facile purification of recombinant silk-elastin-like polymers in auto induction shake flask cultures." *Amb Express*, **3**, 11.
- Main, E. R., Lowe, A. R., Mochrie, S. G., Jackson, S. E. und Regan, L. (2005). "A recurring theme in protein engineering: the design, stability and folding of repeat proteins." *Current opinion in structural biology*, **15**, 464-471.
- Malakhov, M. P., Mattern, M. R., Malakhova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D. und Butt, T. R. (2004). "SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins." *Journal of structural and functional genomics*, **5**, 75-86.
- Malik, A. (2016). "Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. coli*." *3 Biotech*, **6**, 1-7.
- Manchester, K. L. (1996). "Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations." *Biotechniques*, **20**, 968-970.
- Marblestone, J. G., Edavettal, S. C., Lim, Y., Lim, P., Zuo, X. und Butt, T. R. (2006). "Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO." *Protein Science*, **15**, 182-189.
- Martens, A. A., Portale, G., Werten, M. W., de Vries, R. J., Eggink, G., Cohen Stuart, M. A. und de Wolf, F. A. (2009a). "Triblock protein copolymers forming supramolecular nanotapes and pH-responsive gels." *Macromolecules*, **42**, 1002-1009.
- Martens, A. A., van der Gucht, J., Eggink, G., de Wolf, F. A. und Stuart, M. A. C. (2009b). "Dilute gels with exceptional rigidity from self-assembling silk-collagen-like block copolymers." *Soft Matter*, **5**, 4191-4197.
- Martinez Rodriguez, N. R., Das, S., Kaufman, Y., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2015). "Interfacial pH during mussel adhesive plaque formation." *Biofouling*, **31**, 221-227.
- Marumo, K. und Waite, J. (1986). "Optimization of hydroxylation of tyrosine and tyrosine-containing peptides by mushroom tyrosinase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **872**, 98-103.
- Marutzky, R. "Opening and thematic introduction." *Proceedings of the Technical Formaldehyde Conference*.

- Marx, K. A. (2003). "Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution– surface interface." *Biomacromolecules*, **4**, 1099-1120.
- Maskarinec, S. A. und Tirrell, D. A. (2005). "Protein engineering approaches to biomaterials design." *Current opinion in biotechnology*, **16**, 422-426.
- Matsuura, T., Ernst, A., Zechel, D. L. und Plückthun, A. (2004). "Combinatorial approaches to novel proteins." *ChemBioChem*, **5**, 177-182.
- Mattiuzzo, M., De Gobba, C., Runti, G., Mardirossian, M., Bandiera, A., Gennaro, R. und Scocchi, M. (2014). "Proteolytic activity of Escherichia coli oligopeptidase B against proline-rich antimicrobial peptides." *J Microbiol Biotechnol*, **24**, 160-167.
- McCarter, J. D., Stephens, D., Shoemaker, K., Rosenberg, S., Kirsch, J. F. und Georgiou, G. (2004). "Substrate specificity of the Escherichia coli outer membrane protease OmpT." *Journal of Bacteriology*, **186**, 5919-5925.
- McPherson, D. T., Xu, J. und Urry, D. W. (1996). "Product Purification by Reversible Phase Transition Following Escherichia coli Expression of Genes Encoding up to 251 Repeats of the Elastomeric Pentapeptide GVGVP." *Protein Expression and Purification*, **7**, 51-57.
- Meerman, H. J. und Georgiou, G. (1994). "Construction and characterization of a set of E. coli strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins." *Bio/technology*, **12**, 1107-1110.
- Melnikov, S. V. und Söll, D. (2019). "Aminoacyl-tRNA Synthetases and tRNAs for an Expanded Genetic Code: What Makes them Orthogonal?" *International journal of molecular sciences*, **20**, 1929.
- Mende, M. (2022). "Produktion und *in vitro* Prolyl-4-Hydroxylierung von rekombinantem humanem Tropoelastin (Isoform 2)", Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle.
- Meredith, H. J., Jenkins, C. L. und Wilker, J. J. (2014). "Enhancing the adhesion of a biomimetic polymer yields performance rivaling commercial glues." *Advanced functional materials*, **24**, 3259-3267.
- Meyer, D. E. und Chilkoti, A. (1999). "Purification of recombinant proteins by fusion with thermally-responsive polypeptides." *Nature biotechnology*, **17**, 1112.
- Meyer, D. E. und Chilkoti, A. (2002). "18 Protein Purification by Inverse Transition Cycling." *Protein-protein interactions: A molecular cloning manual*, 329-344.
- Meyer, D. E. und Chilkoti, A. (2004). "Quantification of the effects of chain length and concentration on the thermal behavior of elastin-like polypeptides." *Biomacromolecules*, **5**, 846-851.
- Mian, S. A., Saha, L. C., Jang, J., Wang, L., Gao, X. und Nagase, S. (2010). "Density functional theory study of catechol adhesion on silica surfaces." *The Journal of Physical Chemistry C*, **114**, 20793-20800.
- Mian, S. A., Yang, L.-M., Saha, L. C., Ahmed, E., Ajmal, M. und Ganz, E. (2014). "A fundamental understanding of catechol and water adsorption on a hydrophilic silica surface: exploring the underwater adhesion mechanism of mussels on an atomic scale." *Langmuir*, **30**, 6906-6914.
- Mizuguchi, Y., Mashimo, Y., Mie, M. und Kobatake, E. (2017). "Design of bFGF-tethered self-assembling extracellular matrix proteins via coiled-coil triple-helix formation." *Biomedical Materials*, **12**, 045021.
- Morgan, D. (1990). "Two firms race to derive profits from mussels glue: despite gaps in their knowledge of how the mollusk produces the adhesive, scientists hope to recreate it." *Scientist*, **4**, 1.
- Müller, M. (2015). "Klebstoffe - Benennungen und Definitionen; Deutsche Fassung EN 923:2015." <https://www.din.de/de/mitwirken/normenausschuesse/nmp/wdc-beuth:din21:246519375>
- Nagarsekar, A., Crissman, J., Crissman, M., Ferrari, F., Cappello, J. und Ghandehari, H. (2002). "Genetic synthesis and characterization of pH-and temperature-sensitive silk-elastinlike protein block copolymers." *Journal of Biomedical Materials Research: An*

- Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **62**, 195-203.
- Nallamsetty, S. und Waugh, D. S. (2007). "A generic protocol for the expression and purification of recombinant proteins in *Escherichia coli* using a combinatorial His6-maltose binding protein fusion tag." *Nature protocols*, **2**, 383-391.
- National-Toxicology-Programm. (2011). "Report on Carcinogens." National Toxicology Program: Research Triangle Park, Services, U. D. o. H. a. H., ed., NC, USA.
- Numata, K. und Baker, P. J. (2014). "Synthesis of adhesive peptides similar to those found in blue mussel (*Mytilus edulis*) using papain and tyrosinase." *Biomacromolecules*, **15**, 3206-3212.
- Ogi, H., Motohisa, K., Hatanaka, K., Ohmori, T., Hirao, M. und Nishiyama, M. (2007). "Concentration dependence of IgG-protein A affinity studied by wireless-electrodeless QCM." *Biosensors and Bioelectronics*, **22**, 3238-3242.
- Onusseit, H. (2004). "Klebstoffe der Natur: Anwendung und Perspektiven für die Technik." *Biologie in unserer Zeit*, **34**, 307-314.
- Ozawa, K., Headlam, M. J., Mouradov, D., Watt, S. J., Beck, J. L., Rodgers, K. J., Dean, R. T., Huber, T., Otting, G. und Dixon, N. E. (2005). "Translational incorporation of L-3, 4-dihydroxyphenylalanine into proteins." *The FEBS journal*, **272**, 3162-3171.
- Ozsvar, J., Yang, C., Cain, S. A., Baldock, C., Tarakanova, A. und Weiss, A. S. (2021). "Tropoelastin and Elastin Assembly." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **9**, 138.
- Pacaud, M. und Richaud, C. (1975). "Protease II from *Escherichia coli*. Purification and characterization." *Journal of Biological Chemistry*, **250**, 7771-7779.
- Papov, V. V., Diamond, T. V., Biemann, K. und Waite, J. H. (1995). "Hydroxyarginine-containing polyphenolic proteins in the adhesive plaques of the marine mussel *Mytilus edulis*." *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 20183-20192.
- Park, J.-E. und Won, J.-I. (2009). "Thermal behaviors of elastin-like polypeptides (ELPs) according to their physical properties and environmental conditions." *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **14**, 662-667.
- Parks, G. A. (1965). "The isoelectric points of solid oxides, solid hydroxides, and aqueous hydroxo complex systems." *Chemical Reviews*, **65**, 177-198.
- Partridge, S. (1963). "Elastin." In: *Advances in protein chemistry*, Elsevier, 227-302, 17.
- Paz, M., Flückiger, R., Boak, A., Kagan, H. und Gallop, P. M. (1991). "Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining." *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 689-692.
- Penfold, J., Staples, E., Tucker, I. und Thomas, R. (2002). "Adsorption of mixed anionic and nonionic surfactants at the hydrophilic silicon surface." *Langmuir*, **18**, 5755-5760.
- Petka, W. A., Harden, J. L., McGrath, K. P., Wirtz, D. und Tirrell, D. A. (1998). "Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins." *science*, **281**, 389-392.
- Petrone, L., Kumar, A., Sutanto, C. N., Patil, N. J., Kannan, S., Palaniappan, A., Amini, S., Zappone, B., Verma, C. und Miserez, A. (2015). "Mussel adhesion is dictated by time-regulated secretion and molecular conformation of mussel adhesive proteins." *Nature communications*, **6**, 8737.
- Pizzi, A. und Mittal, K. (2003). "Urea-formaldehyde adhesives." *Handbook of adhesive technology*, **2**.
- Pizzi, A., Papadopoulos, A. N. und Policardi, F. (2020). "Wood composites and their polymer binders." *Polymers*, **12**, 1115.
- Platko, J. D., Deeg, M., Thompson, V., Al-Hinai, Z., Glick, H., Pontius, K., Colussi, P., Taron, C. und Kaplan, D. L. (2008). "Heterologous expression of *Mytilus californianus* foot protein three (Mcfp-3) in *Kluyveromyces lactis*." *Protein expression and purification*, **57**, 57-62.
- Plonka, P. M. und Grabacka, M. (2006). "Melanin synthesis in microorganisms--biotechnological and medical aspects." *Acta Biochimica Polonica*, **53**, 429-443.
- Pretzler, M., Bijelic, A. und Rompel, A. (2017). "Heterologous expression and characterization of functional mushroom tyrosinase (Ab PPO4)." *Scientific reports*, **7**, 1-10.

- Prokopakis, G. J. und Asenjo, J. A. (2020). "Synthesis of downstream processes." *Separation processes in biotechnology*, 571-602.
- Qin, G., Rivkin, A., Lapidot, S., Hu, X., Preis, I., Arinus, S. B., Dgany, O., Shoseyov, O. und Kaplan, D. L. (2011). "Recombinant exon-encoded resilins for elastomeric biomaterials." *Biomaterials*, **32**, 9231-9243.
- Qiu, W., Huang, Y., Teng, W., Cohn, C. M., Cappello, J. und Wu, X. (2010). "Complete recombinant silk-elastinlike protein-based tissue scaffold." *Biomacromolecules*, **11**, 3219-3227.
- Rescigno, A., Zucca, P., Flurkey, A., Inlow, J. und Flurkey, W. H. (2007). "Identification and discrimination between some contaminant enzyme activities in commercial preparations of mushroom tyrosinase." *Enzyme and microbial technology*, **41**, 620-627.
- Rev. "Bei dieser Zitation handelt es sich um einen Review."
- Riesenberg, D., Menzel, K., Schulz, V., Schumann, K., Veith, G., Zuber, G. und Knorre, W. A. (1990). "High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1." *Applied microbiology and biotechnology*, **34**, 77-82.
- Robb, D. A. und Gutteridge, S. (1981). "Polypeptide composition of two fungal tyrosinases." *Phytochemistry*, **20**, 1481-1485.
- Roberto, F. F. und Silverman, H. G. (2010). "Adhesive Proteins from Mussels." In: *Innovations in Materials Manufacturing, Fabrication, and Environmental Safety*, CRC Press, 71-104.
- Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C. A., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M. und Kasemo, B. (1997). "Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion." *Faraday discussions*, **107**, 229-246.
- Rodríguez-Cabello, J. C., Prieto, S., Arias, F., Reguera, J. und Ribeiro, A. (2006). "Nanobiotechnological approach to engineered biomaterial design: the example of elastin-like polymers."
- Rodríguez, R., Blesa, M. A. und Regazzoni, A. E. (1996). "Surface complexation at the TiO<sub>2</sub> (anatase)/aqueous solution interface: chemisorption of catechol." *Journal of colloid and interface science*, **177**, 122-131.
- Rozkov, A. und Enfors, S.-O. (2004). "Analysis and control of proteolysis of recombinant proteins in *Escherichia coli*." *Physiological Stress Responses in Bioprocesses*, 163-195.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2006). "Transformation of *E. coli* by electroporation." *Cold Spring Harbor Protocols*, **2006**, pdb. prot3933.
- Sauerbrey, G. (1959). "Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung." *Zeitschrift für physik*, **155**, 206-222.
- Saven, J. G. (2002). "Combinatorial protein design." *Current opinion in structural biology*, **12**, 453-458.
- Schälte, M. und Lück, G. (2020). "Glue till you drop—Experiments on Historical Adhesives." *CHEMKON*, **27**, 314-321.
- Schein, C. H. und Noteborn, M. H. (1988). "Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature." *Bio/technology*, **6**, 291-294.
- Schipperus, R., Eggink, G. und de Wolf, F. A. (2012). "Secretion of elastin-like polypeptides with different transition temperatures by *Pichia pastoris*." *Biotechnology progress*, **28**, 242-247.
- Schmelzer, C. E. und Duca, L. (2021). "Elastic fibers: formation, function, and fate during aging and disease." *The FEBS Journal*.
- Schmidt, G., Woods, J. T., Fung, L. X. B., Gilpin, C. J., Hamaker, B. R. und Wilker, J. J. (2019). "Strong adhesives from corn protein and tannic acid." *Advanced Sustainable Systems*, **3**, 1900077.
- Selinheimo, E., Gasparetti, C., Mattinen, M.-L., Steffensen, C. L., Buchert, J. und Kruus, K. (2009). "Comparison of substrate specificity of tyrosinases from *Trichoderma reesei* and *Agaricus bisporus*." *Enzyme and Microbial Technology*, **44**, 1-10.
- Service, R. F. (2020). "'The game has changed.' AI triumphs at protein folding." American Association for the Advancement of Science.

- Shao, H., Bachus, K. N. und Stewart, R. J. (2009). "A Water-Borne Adhesive Modeled after the Sandcastle Glue of *P. californica*." *Macromolecular bioscience*, **9**, 464-471.
- Shen, W., Kornfield, J. A. und Tirrell, D. A. (2007). "Dynamic properties of artificial protein hydrogels assembled through aggregation of leucine zipper peptide domains." *Macromolecules*, **40**, 689-692.
- Shen, W., Lammertink, R. G., Sakata, J. K., Kornfield, J. A. und Tirrell, D. A. (2005). "Assembly of an artificial protein hydrogel through leucine zipper aggregation and disulfide bond formation." *Macromolecules*, **38**, 3909-3916.
- Silverman, H. G. und Roberto, F. F. (2007). "Understanding marine mussel adhesion." *Marine Biotechnology*, **9**, 661-681.
- Silverman, H. G. und Roberto, F. F. (2010). "Byssus formation in *Mytilus*." In: *Biological adhesive systems*, Springer, 273-283.
- Singha, T. K., Gulati, P., Mohanty, A., Khasa, Y. P., Kapoor, R. K. und Kumar, S. (2017). "Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: a review." *Process Biochemistry*, **55**, 17-31.
- Smith, A. M. und Callow, J. A. (2006). "Biological adhesives." Springer, 23.
- Smith, P. e., Krohn, R. I., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B. und Klenk, D. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Analytical biochemistry*, **150**, 76-85.
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R. und Durbin, R. (1997). "Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments." *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, **28**, 405-420.
- Srokowski, E. M. und Woodhouse, K. A. (2013). "Surface and adsorption characteristics of three elastin-like polypeptide coatings with varying sequence lengths." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **24**, 71-84.
- Standardization, I. O. f. (1998). "Plastics--Standard Atmospheres for Conditioning and Testing: Plastiques--Atmosphères Normales de Conditionnement Et Déssai. Rectificatif Technique 1. Technical Corrigendum 1." ISO.
- Stewart, R. J. (2011). "Protein-based underwater adhesives and the prospects for their biotechnological production." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**, 27-33.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986). "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes." *Journal of molecular biology*, **189**, 113-130.
- Studtmeister, M. (2012). "Untersuchungen zur Optimierung der Produktion und Reinigung von Tropoelastin in bzw. aus *Escherichia coli*," Institute of Pharmacy, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg.
- Stumpp, T., Wilms, B. und Attenbuchner, J. (2000). "Ein neues, L-rhamnose-induzierbares expressionssystem für *Escherichia coli*." *BIO SPEKTRUM-HEIDELBERG*-, **6**, 33-36.
- Su, R. S.-C., Kim, Y. und Liu, J. C. (2014). "Resilin: protein-based elastomeric biomaterials." *Acta Biomaterialia*, **10**, 1601-1611.
- Substitutionspotenziale, K. (2010). "Entwicklung von Förderinstrumenten für die stoffliche Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen in Deutschland (Kurzfassung)."
- Sun, F., Zhang, W.-B., Mahdavi, A., Arnold, F. H. und Tirrell, D. A. (2014). "Synthesis of bioactive protein hydrogels by genetically encoded SpyTag-SpyCatcher chemistry." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **111**, 11269-11274.
- Sutherland, T. D., Huson, M. G. und Rapson, T. D. (2018). "Rational design of new materials using recombinant structural proteins: Current state and future challenges." *Journal of structural biology*, **201**, 76-83.
- Tamburro, A. M., Bochicchio, B. und Pepe, A. (2003). "Dissection of human tropoelastin: exon-by-exon chemical synthesis and related conformational studies." *Biochemistry*, **42**, 13347-13362.
- Tanford, C. (1968). "Protein denaturation." *Advances in protein chemistry*, **23**, 121-282.
- Tarakanova, A., Yeo, G. C., Baldock, C., Weiss, A. S. und Buehler, M. J. (2018). "Molecular model of human tropoelastin and implications of associated mutations." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, 7338-7343.

- Tarakanova, A., Yeo, G. C., Baldock, C., Weiss, A. S. und Buehler, M. J. (2019). "Tropoelastin is a flexible molecule that retains its canonical shape." *Macromolecular bioscience*, **19**, 1800250.
- Taylor, S. W. (2002). "Chemoenzymatic synthesis of peptidyl 3, 4-dihydroxyphenylalanine for structure–activity relationships in marine invertebrate polypeptides." *Analytical biochemistry*, **302**, 70-74.
- Taylor, T., Denson, J.-P. und Esposito, D. (2017). "Optimizing expression and solubility of proteins in *E. coli* using modified media and induction parameters." In: *Heterologous Gene Expression in E. coli*, Springer, 65-82.
- Thoring, L., Dondapati, S. K., Stech, M., Wüstenhagen, D. A. und Kubick, S. (2017). "High-yield production of "difficult-to-express" proteins in a continuous exchange cell-free system based on CHO cell lysates." *Scientific reports*, **7**, 1-15.
- Thümmler, A. (2018). "Expression und Charakterisierung von A $\beta$ -Peptiden und deren Spaltung durch die Acylpeptidhydrolase," Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Trabicc-Carlson, K., Meyer, D., Liu, L. a., Piervincenzi, R., Nath, N., LaBean, T. und Chilkoti, A. (2004). "Effect of protein fusion on the transition temperature of an environmentally responsive elastin-like polypeptide: a role for surface hydrophobicity?" *Protein Engineering Design and Selection*, **17**, 57-66.
- Trinh, R., Gurbaxani, B., Morrison, S. L. und Seyfzadeh, M. (2004). "Optimization of codon pair use within the (GGGS) 3 linker sequence results in enhanced protein expression." *Molecular immunology*, **40**, 717-722.
- Tripathi, N. (2009). "High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*." *Defence Science Journal*, **59**, 137.
- Tsuru, D. und Yoshimoto, T. (1994). "[15] Oligopeptidase B: Protease II from *Escherichia coli*." In: *Methods in enzymology*, Elsevier, 201-215, 244.
- Tyedmers, J., Mogk, A. und Bukau, B. (2010). "Cellular strategies for controlling protein aggregation." *Nature reviews Molecular cell biology*, **11**, 777-788.
- Urry, D., Long, M. und Gross, E. (1976). "Conformations of the repeat peptides of elastin in solution: An application of proton and carbon-13 magnetic resonance to the determination of polypeptide secondary structur." *CRC critical reviews in biochemistry*, **4**, 1-45.
- Urry, D. W., Trapane, T. und Prasad, K. (1985). "Phase-structure transitions of the elastin polypentapeptide–water system within the framework of composition–temperature studies." *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, **24**, 2345-2356.
- Urushida, Y., Nakano, M., Matsuda, S., Inoue, N., Kanai, S., Kitamura, N., Nishino, T. und Kamino, K. (2007). "Identification and functional characterization of a novel barnacle cement protein." *The FEBS journal*, **274**, 4336-4346.
- van Hest, J. C. und Tirrell, D. A. (2001). "Protein-based materials, toward a new level of structural control." *Chemical Communications*, 1897-1904.
- Vendruscolo, M. und Dobson, C. M. (2005). "A glimpse at the organization of the protein universe." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 5641-5642.
- Venkatachalam, C. und Urry, D. (1981). "Development of a linear helical conformation from its cyclic correlate.  $\beta$ -Spiral model of the elastin poly (pentapeptide)(VPGVG) n." *Macromolecules*, **14**, 1225-1229.
- Vig, J. R. (1985). "UV/ozone cleaning of surfaces." *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, **3**, 1027-1034.
- Von Byern, J. und Grunwald, I. (2010). "Biological adhesive systems." *From Nature to Technical and Medical Application*.
- Vreeland, V., Waite, J. H. und Epstein, L. (1998). "Minireview—polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels." *Journal of Phycology*, **34**, 1-8.
- Vrhovski, B., Jensen, S. und Weiss, A. S. (1997). "Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin." *European Journal of Biochemistry*, **250**, 92-98.
- Vrhovski, B. und Weiss, A. S. (1998). "Biochemistry of tropoelastin." *European Journal of Biochemistry*, **258**, 1-18.
- Waite, H. (1983a). "Adhesion in byssally attached bivalves." *Biological Reviews*, **58**, 209-231.

- Waite, J. und Andersen, S. (1978a). "DOPA in an insoluble shell protein of *Mytilus edulis*." *Biochim. Biophys. Acta*, **541**, 107-114.
- Waite, J. H. (1983b). "Evidence for a repeating 3, 4-dihydroxyphenylalanine-and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L." *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 2911-2915.
- Waite, J. H. (1985). "Catechol oxidase in the byssus of the common mussel, *Mytilus edulis* L." *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **65**, 359-371.
- Waite, J. H. (2017). "Mussel adhesion—essential footwork." *Journal of Experimental Biology*, **220**, 517-530.
- Waite, J. H. und Andersen, S. (1978b). "3, 4-Dihydroxyphenylalanine in an insoluble shell protein of *Mytilus edulis*." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **541**, 107-114.
- Waite, J. H. und Andersen, S. O. (1980). "3, 4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) and sclerotization of periostracum in *Mytilus edulis* L." *The Biological Bulletin*, **158**, 164-173.
- Waite, J. H. und Benedict, C. V. (1984). "Assay of dihydroxyphenylalanine (dopa) in invertebrate structural proteins." In: *Methods in enzymology*, Elsevier, 397-413, 107.
- Waite, J. H. und Qin, X. (2001). "Polyphosphoprotein from the adhesive pads of *Mytilus edulis*." *Biochemistry*, **40**, 2887-2893.
- Waite, J. H. und Tanzer, M. L. (1981). "Polyphenolic substance of *Mytilus edulis*: novel adhesive containing L-dopa and hydroxyproline." *science*, **212**, 1038-1040.
- Walls, F. L. und Gagnepain, J.-J. (1992). "Environmental sensitivities of quartz oscillators." *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, **39**, 241-249.
- Wang, J. und Scheibel, T. (2018a). "Coacervation of the recombinant *Mytilus galloprovincialis* foot protein-3b." *Biomacromolecules*, **19**, 3612-3619.
- Wang, J. und Scheibel, T. (2018b). "Recombinant production of mussel byssus inspired proteins." *Biotechnology journal*, **13**, 1800146.
- Wang, Q., Xia, X., Huang, W., Lin, Y., Xu, Q. und Kaplan, D. L. (2014). "High Throughput Screening of Dynamic Silk-Elastin-Like Protein Biomaterials." *Advanced Functional Materials*, **24**, 4303-4310.
- Weber, A. und Krug, D. "Proteine als Klebstoffalternative für Massivholzplatten." *Internationales Symposium "Werkstoffe aus Nachwachsenden Rohstoffen"*, Erfurt.
- Wegerer, A., Sun, T. und Altenbuchner, J. (2008). "Optimization of an *E. coli* L-rhamnose-inducible expression vector: test of various genetic module combinations." *BMC biotechnology*, **8**, 2.
- Wei, W., Yu, J., Gebbie, M. A., Tan, Y., Martinez Rodriguez, N. R., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2015). "Bridging adhesion of mussel-inspired peptides: Role of charge, chain length, and surface type." *Langmuir*, **31**, 1105-1112.
- Wessels, A., Klöckner, B., Siering, C. und Waldvogel, S. R. (2013). "Practical strategies for stable operation of HFF-QCM in continuous air flow." *Sensors*, **13**, 12012-12029.
- Whittaker, J. W. (2013). "Cell-free protein synthesis: the state of the art." *Biotechnology letters*, **35**, 143-152.
- Wichers, H., Recourt, K., Hendriks, M., Ebbelaar, C., Biancone, G., Hoerberichts, F., Mooibroek, H. und Soler-Rivas, C. (2003). "Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*." *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**, 336-341.
- Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. und Chapelon, C. G. (1996). "Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*." *Phytochemistry*, **43**, 333-337.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D. und Fitzpatrick, J. D. (1988). "Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation." *Analytical biochemistry*, **175**, 231-237.
- Wilfinger, W. W., Mackey, K. und Chomczynski, P. (1997). "Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity." *Biotechniques*, **22**, 474-481.
- Wilke, P. und Börner, H. G. (2012). "Mussel-Glue Derived Peptide-Polymer Conjugates to Realize Enzyme-Activated Antifouling Coatings." *ACS Macro Letters*, **1**, 871-875.
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Sylđatk, C., Mattes, R., Siemann, M. und Altenbuchner, J. (2001). "High-cell-density fermentation for production of L-N-carbamoylase using an

- expression system based on the Escherichia coli rhaBAD promoter." *Biotechnology and bioengineering*, **73**, 95-103.
- Winkler, S., Szela, S., Avtges, P., Valluzzi, R., Kirschner, D. A. und Kaplan, D. (1999). "Designing recombinant spider silk proteins to control assembly." *International Journal of Biological Macromolecules*, **24**, 265-270.
- Wise, S. G. und Weiss, A. S. (2009). "Tropoelastin." *The international journal of biochemistry & cell biology*, **41**, 494-497.
- Wolfram, M. (2018). "Untersuchungen zur Produktion und zielgerichteten Immobilisierung rekombinanter Lipasen."
- Wurm, D. J. (2016). "Novel Methods to facilitate Escherichia coli bioprocess development," Wien.
- Xia, X.-X., Qian, Z.-G., Ki, C. S., Park, Y. H., Kaplan, D. L. und Lee, S. Y. (2010). "Native-sized recombinant spider silk protein produced in metabolically engineered Escherichia coli results in a strong fiber." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**, 14059-14063.
- Xia, X.-X., Xu, Q., Hu, X., Qin, G. und Kaplan, D. L. (2011). "Tunable self-assembly of genetically engineered silk-elastin-like protein polymers." *Biomacromolecules*, **12**, 3844-3850.
- Yamamoto, H., Sakai, Y. und Ohkawa, K. (2000). "Synthesis and wettability characteristics of model adhesive protein sequences inspired by a marine mussel." *Biomacromolecules*, **1**, 543-551.
- Yang, B., Ayyadurai, N., Yun, H., Choi, Y. S., Hwang, B. H., Huang, J., Lu, Q., Zeng, H. und Cha, H. J. (2014a). "In Vivo Residue-Specific Dopa-Incorporated Engineered Mussel Bioglue with Enhanced Adhesion and Water Resistance." *Angewandte Chemie International Edition*, **53**, 13360-13364.
- Yang, B., Ayyadurai, N., Yun, H., Choi, Y. S., Hwang, B. H., Huang, J., Lu, Q., Zeng, H. und Cha, H. J. (2014b). "In vivo residue-specific dopa-incorporated engineered mussel bioglue with enhanced adhesion and water resistance." *Angewandte Chemie*, **126**, 13578-13582.
- Yang, B., Kang, D. G., Seo, J. H., Choi, Y. S. und Cha, H. J. (2013). "A comparative study on the bulk adhesive strength of the recombinant mussel adhesive protein fp-3." *Biofouling*, **29**, 483-490.
- Yang, B., Lim, C., Hwang, D. S. und Cha, H. J. (2016). "Switch of Surface Adhesion to Cohesion by Dopa-Fe<sup>3+</sup> Complexation, in Response to Microenvironment at the Mussel Plaque/Substrate Interface." *Chemistry of Materials*, **28**, 7982-7989.
- Yang, Y. J., Jung, D., Yang, B., Hwang, B. H. und Cha, H. J. (2014c). "Aquatic proteins with repetitive motifs provide insights to bioengineering of novel biomaterials." *Biotechnology journal*, **9**, 1493-1502.
- Yao, L., Wang, X., Xue, R., Xu, H., Wang, R., Zhang, L. und Li, S. (2022). "Comparative analysis of mussel foot protein 3B co-expressed with tyrosinases provides a potential adhesive biomaterial." *International Journal of Biological Macromolecules*, **195**, 229-236.
- Yeboah, A., Cohen, R. I., Rabolli, C., Yarmush, M. L. und Berthiaume, F. (2016). "Elastin-like polypeptides: A strategic fusion partner for biologics." *Biotechnology and bioengineering*, **113**, 1617-1627.
- Yu, J., Kan, Y., Rapp, M., Danner, E., Wei, W., Das, S., Miller, D. R., Chen, Y., Waite, J. H. und Israelachvili, J. N. (2013). "Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 15680-15685.
- Yu, J., Wei, W., Danner, E., Ashley, R. K., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2011a). "Mussel protein adhesion depends on interprotein thiol-mediated redox modulation." *Nature chemical biology*, **7**, 588-590.
- Yu, J., Wei, W., Danner, E., Israelachvili, J. N. und Waite, J. H. (2011b). "Effects of interfacial redox in mussel adhesive protein films on mica." *Advanced Materials*, **23**, 2362-2366.
- Yu, M. und Deming, T. J. (1998). "Synthetic polypeptide mimics of marine adhesives." *Macromolecules*, **31**, 4739-4745.

- Zaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A. und Naaz, I. (2014). "Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry." *Biochemistry research international*, **2014**.
- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C. und Kubick, S. (2015). "Cell-free protein synthesis: pros and cons of prokaryotic and eukaryotic systems." *ChemBioChem*, **16**, 2420-2431.
- Zeng, Q., Desai, M. S., Jin, H.-E., Lee, J. H., Chang, J. und Lee, S.-W. (2016). "Self-healing elastin–bioglass hydrogels." *Biomacromolecules*, **17**, 2619-2625.
- Zhao, H., Robertson, N. B., Jewhurst, S. A. und Waite, J. H. (2006). "Probing the adhesive footprints of *Mytilus californianus* byssus." *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 11090-11096.
- Zhao, H., Sun, C., Stewart, R. J. und Waite, J. H. (2005). "Cement proteins of the tube-building polychaete *Phragmatopoma californica*." *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 42938-42944.
- Zhou, J., Panaitiu, A. E. und Grigoryan, G. (2020). "A general-purpose protein design framework based on mining sequence–structure relationships in known protein structures." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **117**, 1059-1068.

## 8 Anhang

Die Zusammensetzung des finalen M9-Mediums. Diese ist an das ATCC Medium „Modifiziertes Wolfe's Minimal Medium“ (2672) angelehnt.

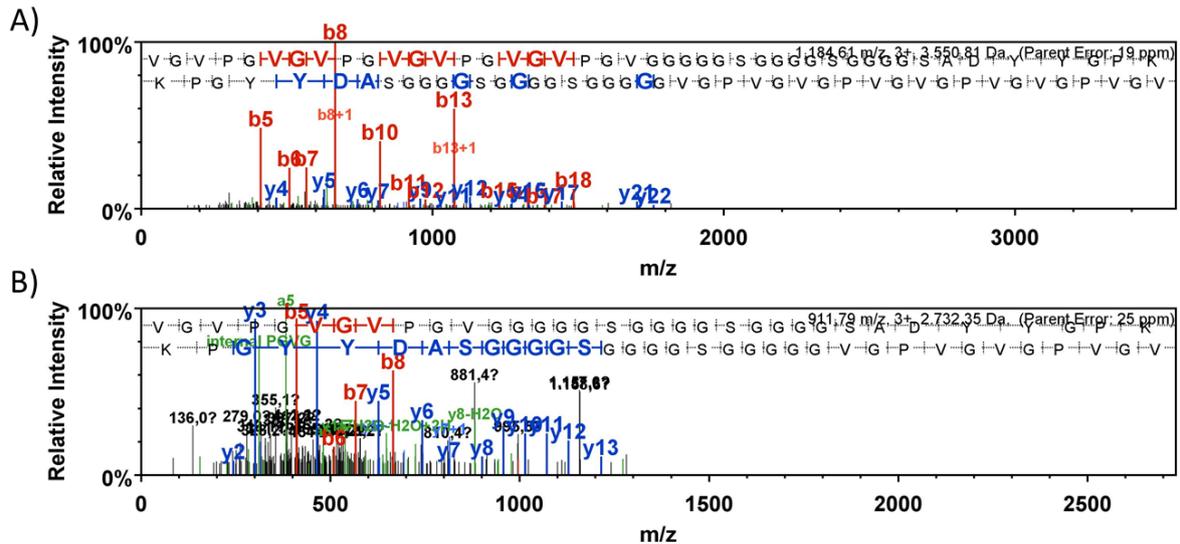
**Tabelle 8-1 Zusammensetzung des verwendeten M9-Mediums (NTA – Nitritotriessigsäure).**

Komponente	Volumen (mL)	Zusammensetzung
M9 Salze	100	75,2 g/L Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · x 2H <sub>2</sub> O; 30 g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 5 g/L NaCl; 5 g/L NH <sub>4</sub> Cl
20 % Glucose	20	66 g in 300 mL dH <sub>2</sub> O
2 M MgSO <sub>4</sub>	1	98.6 g in 200 mL dH <sub>2</sub> O
0,1 M CaCl <sub>2</sub>	1	2.22 g in 200 mL dH <sub>2</sub> O
Wolfe's Minerallösung	10	1,5 g/L NTA; 3 g/L MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O; 0,5 g/L MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O; 1 g/L NaCl; 0,1 g/L FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O; 0,1 g/L CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O; 0,1 g/L CaCl <sub>2</sub> ; 0,1 g/L ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O; 0,01 g/L CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O; 0,01 g/L AlK(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> · 12 H <sub>2</sub> O; 0,01 g/L H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,01 g/L Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
Wolfe's Vitaminlösung	10	2 mg/L Biotin; 2 mg/L Folsäure; 10 mg/L Pyridoxinhydrochlorid; 5 mg/L Thiamin; 5 mg/L Riboflavin; 5 mg/L Nikotinsäure; 5 mg/L Calcium D-(+)- Pantothenensäure; 0,1 mg/L Vitamin B12; 5 mg/L p-Aminobenzoensäure, 5 mg/L Liponsäure
dH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 1 L	

### 8.1 Massenspektrometrische Analysen

#### 8.1.1 Analysen durchgeführt in der Core Facility – Proteomic Mass Spectrometry (MLU Halle)

Nachfolgend ist die massenspektrometrische Analyse der Proteinbande bei ca. 38 kDa nach Reinigung von DP1B mittels *Inverse transition cycling* (ITC) im kleinen Maßstab gezeigt (Kap. 3.2.3.2.2, S. 74). Die Proteinbande aus dem SDS-PA-Gel (Abb. 8-13, S. 179) wurde mittels Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 mL-Gefäß überführt. Die anschließende tryptische Verdau und die ESI-MS-Analyse wurden von Dr. Matt Fuszard (*Core Facility – Proteomic Mass Spectrometry*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 8-1 gezeigt. Es konnten zwei spezifische Peptide der DP1B-Sequenz detektiert werden.



**Abb. 8-1** Massenspektrometrische Analyse der 38 kDa Bande nach Reinigung von DP1B mittels *Inverse transition cycling* (ITC)

ESI-MS Analyse der 38 kDa-Bande. Dargestellt ist das Massenspektrum der Probe nach Reinigung von DP1B mittels ITC. Es konnten zwei spezifische Peptide der DP1B-Sequenz detektiert werden. A) Peptid 1 (GVGVPGVGVPGVGVPGVGVPGVGGGGSSGGGGSSGGGGSSADYYGPKY) mit einer Sequenzabdeckung von 95 % und B) Peptid 2 (GVGVPGVGVPGVGVPGVGGGGSSGGGGSSGGGGSSADYYG PKY) mit einer Sequenzabdeckung von 91 %. Die Analysen erfolgten in der *Core Facility – Proteomic Mass Spectrometry* (MLU) und wurden von Dr. Matt Fuszard durchgeführt.

## 8.1.2 Analysen durchgeführt am Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie IZI-MWT Halle (Saale)

### 8.1.2.1 Methode zur Bestimmung der Hydroxylierungen mittels Massenspektrometrischer Analyse

#### 8.1.2.1.1 Flüssigkeitschromatografie

Die Proteinproben wurden vor der MALDI-TOF/TOF Analyse durch Flüssigchromatografie gereinigt. Das verwendete HPLC-System (Agilent 1260 Infinity, Waldbronn, Deutschland) war mit einer Binärpumpe, einem Autosampler mit einer Injektionsschleife von 40  $\mu$ L, einem Säulenofen, einem Entgaser sowie einem Diodenarray und einem Mehrwellenlängendetektor ausgestattet. Die Protein-Elution wurde bei 220 nm verfolgt. Das HPLC-System wurde durch die Software Agilent ChemStation (Version A.02.09) gesteuert.

Die chromatografischen Trennungen wurden auf einer AdvanceBio Peptide Map-Säule (Agilent, Waldbronn, Deutschland) mit einer stationären C18-Phase (150 mm Länge, 3 mm Innendurchmesser, 2,7  $\mu$ m Partikelgröße, 120 Å Porengröße) durchgeführt. Die für die Reinigung der Proteine verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 8-2 zusammengefasst.

**Tabelle 8-2** Bedingungen der Flüssigkeitschromatografie (HPLC)

Parameter	Bedingung
Temperatur der Säule	45 °C
Mobile Phase A:	H <sub>2</sub> O <sub>Milli-Q</sub> /TFA <sub>Spec</sub> (1000; 1, v/v)
Mobile Phase B:	ACN <sub>LC</sub> /TFA <sub>Spec</sub> (1000; 1, v/v)
Flussrate	0,5 mL/min

Gefriergetrocknetes Proteinmaterial wurde in H<sub>2</sub>O/TFA (990/10; v/v) gelöst und jeweils 5 µL der Probe auf die HPLC-Säule injiziert. Von den Flüssigproben wurden direkt 5 µL aufgetragen (Tabelle 8-3). Die Proteinproben wurden mittels Gradientenelution getrennt (Tabelle 8-4) und die Fraktionen wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt. Proteinhaltige Fraktionen wurden auf einem MALDI-Probenträger mit den MALDI- Matrices S-DHB (Mischung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 2-Hydroxy-5-Methoxybenzoesäure) und DHAP (2,5-Dihydroxy-acetophenon) kokristallisiert.

**Tabelle 8-3 Proben zur chromatografischen Auftrennung mittels HPLC vor der MALDI-TOF/TOF Analyse**

Proteinprobe	Konzentration (mg/mL)	Probenvolumen (µL)
Mefp-3	0,20	5
modifiziertes Mefp-3 (löslich)	0,79	5
Resolubilisiertes modifiziertes Mefp-3 aus der unlöslichen Phase	0,06	5
modifizierte DP1A-Variante	0,70	5
modifizierte DP1B-Variante	0,74	5
DP2	0,50	5
modifiziertes DP2	0,30	5

**Tabelle 8-4 Verwendeter HPLC Gradient**

Zeit (min)	0	3	35	45	47,5	50	60
A (%)	95	95	35	5	5	95	95
B (%)	5	5	65	95	95	5	5

### 8.1.2.1.1.2 Massenspektrometrische Analysen

#### 8.1.2.1.1.2.1 Datenerfassung (MALDI-TOF/TOF MS)

Die Massenspektren wurden an einem MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer (Autoflex Speed, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) mit positiver Polarität sowohl im linearen Modus (Molmassenbestimmung) als auch im Reflektormodus (ISD- und T3-Analyse) aufgenommen. Die Bestrahlung der Analyt-haltigen Matrix wurde durch die Verwendung eines Nd:YAG-Lasers (Smart beam-II, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) erreicht, der auf eine Pulsrate von 1 kHz, eine Pulsenergie von 500 µJ und eine Emissionswellenlänge von 355 nm eingestellt war.

Die Spektren wurden mit flexControl (Version 3.4, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) durch Akkumulation von mindestens 10000 Schüssen (pro Probenpunkt) aufgenommen. Die Laserenergie wurde für MS-Experimente leicht über dem Schwellenwert eingestellt. Für die ISD- und T3-Analysen wurde die Laserenergie auf stark erhöhte Werte gesetzt. Die Spektrenverarbeitung wurde mit flexAnalysis (Version 3.4, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) durch Anwendung der Basisliniensubtraktion mit dem TopHat-Algorithmus, Glättung mit dem Savitzky-Golay-Algorithmus und Peak-Erkennung mit dem SNAP-Algorithmus durchgeführt. Das MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer wurde anhand der Massensignale einer Reihe von Standardpeptiden und -proteinen mit bekannten Massen kalibriert (Peptidkalibrierungsstandard II und Proteinkalibrierungsstandard I, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Die für die Kalibrierung verwendeten Spektren wurden mit der gleichen Laserenergie aufgenommen, die auch für die Probenanalyse verwendet wurde.

#### 8.1.2.1.1.2.2 Datenanalyse

Die Bestimmung der Molekülmassen basierte auf den Masse-Ladungs-Verhältnissen ( $m/z$ ) von einfach und mehrfach geladenen Molekülionen, die in den erfassten Massenspektren beobachtet wurden. Jeder Ladungszustand erlaubte die Bestimmung eines Wertes für die Molekülmasse. Somit wurden für jedes Protein mehrere Molekularmassenwerte (einfach-, zweifach-, dreifach- und vierfach-geladene Massen) erhalten. Der jeweilige Mittelwert wurde zum Vergleich mit den theoretischen Molekülmassen der Designer-Proteine verwendet, die anhand der Aminosäuresequenzen im *Open Source Tool* „PeptideMass“ ([https://web.expasy.org/peptide\\_mass/](https://web.expasy.org/peptide_mass/)) berechnet wurden.

Die Zuordnung der ISD- und T3-Fragmentspektren wurde mit Hilfe von BioTools (Version 3.2, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Für die Fragment-Ionen wurden *in silico*  $m/z$ -Werte erzeugt und mit den  $m/z$ -Werten der in den aufgenommenen Spektren beobachteten Fragmentensignalen verglichen. Dieser Ansatz ermöglichte die Identifizierung der terminalen Aminosäuresequenzen sowie die Bestimmung der vorhandenen Modifikationen (Hydroxylierungen).

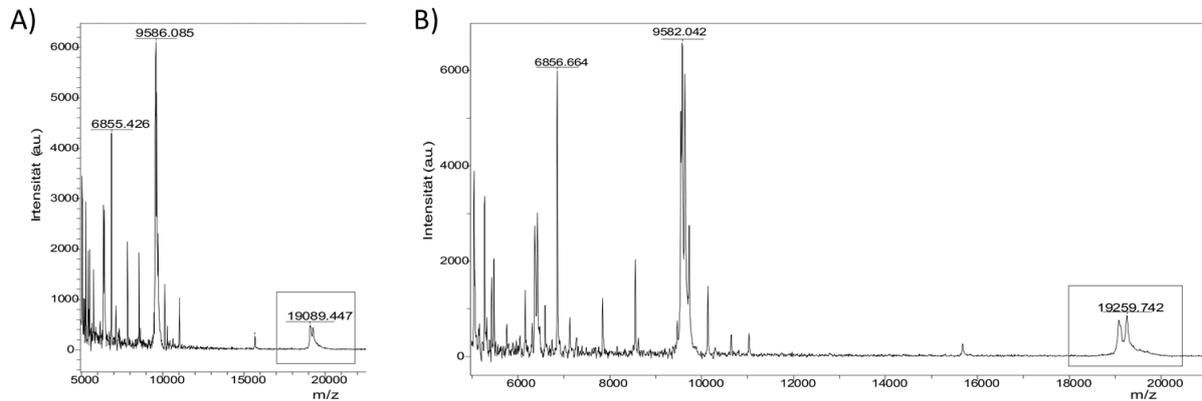
#### 8.1.2.1.1.2.3 Analyse der molekularen Masse

Die aufgenommenen MALDI-TOF-Massenspektren zeigten molekulare Ionensignale für bis zu vier Ladungszustände. Basierend auf den erhaltenen Signalen der Molekül-Ionen wurde die durchschnittliche Molekülmasse der jeweiligen Probe berechnet.

#### 8.1.2.1.1.2.4 *In-source decay* (ISD) Analyse

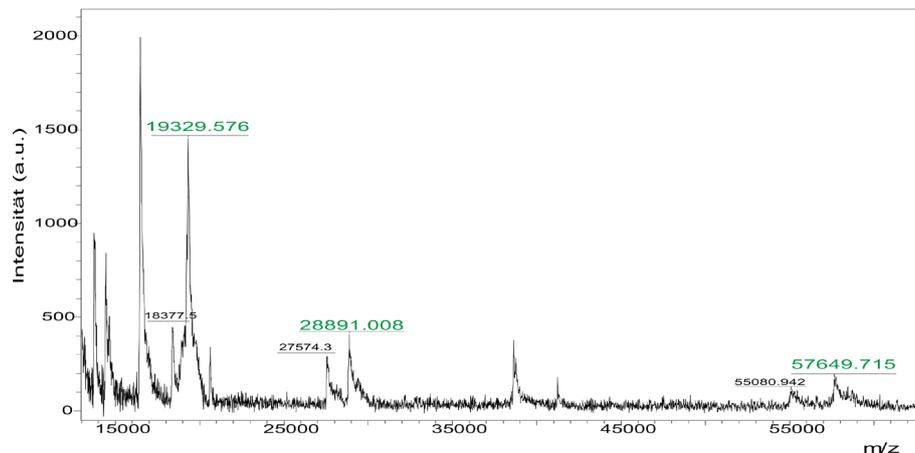
Die Sequenzverifikation der Proteintermini erforderte den Einsatz einer speziellen Technik der Massenspektrometrie, die als *In-Source-Decay* (ISD) bezeichnet wird. Diese Technik verwendet N-terminale (a- und c-Typ) und C-terminale (y- und z-Typ) Fragment-Ionen, die aufgrund eines stark erhöhten Laserenergieniveaus während der Ionisierung erzeugt werden. Die Fragment-Ionen können zur Ableitung der terminalen Aminosäuresequenzen von Proteinen verwendet werden. Es ist jedoch zu beachten, dass ISD eine ungezielte Technik ist. Es ist nicht möglich, die Art der erzeugten Fragmente (N- und C-terminale, oder nur N- oder C-terminale) sowie die Effizienz, mit der sie erzeugt werden, zu beeinflussen. Wenn zwei verschiedene Verbindungen in einer Probe vorhanden sind, dann werden in der Regel Fragment-Ionen beider Spezies detektiert.

### 8.1.2.2 Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen durchgeführt am Fraunhofer IZI-MWT Halle (Saale)



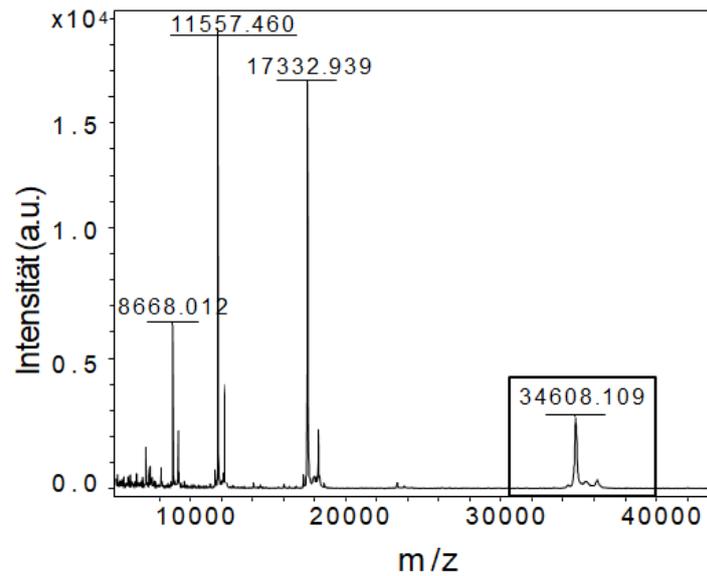
**Abb. 8-2 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 vor und nach der Modifikationsreaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase**

Massenspektrum von His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 vor (A) und nach der Reaktion (B) mit der mikrobiellen Tyrosinase (mTyr). Die Messungen wurden am Fraunhofer IZI-MWT durchgeführt. Die zur Bestimmung des DOPA-Gehaltes verwendeten monoisotopischen Massen des einfach geladenen Molekül-Ions sind gekennzeichnet (nicht-modifiziert: 19089,447 Da, modifiziert: 19259,742 Da).



**Abb. 8-3 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse von DP1A**

MALDI-TOF/TOF-Massenspektrum von DP1A (Vollängenprotein) zur Bestimmung der intakten Proteinmasse (*intact mass analysis*). Insgesamt konnten 3 Ladungszustände von DP1A nachgewiesen werden. Die zugehörigen detektierten monoisotopischen Massen sind in grün hervorgehoben. Zusätzlich wurde eine zweite Proteoform im Massenspektrum nachgewiesen (schwarz markierte Massensignale), die jedoch eine höhere Abweichung zur theoretischen Masse von DP1A aufweist. DP1A besitzt eine theoretische monoisotopischen Masse von 57692,36 Da (bestimmt mit dem *Peptide Mass Calculator*). Die Analysen wurden von Dr. Marcel Naumann (Fraunhofer IZI) durchgeführt („*Dried-droplet*“-Präparation mit 75 % DHAP-Matrix, Reflektormodus).



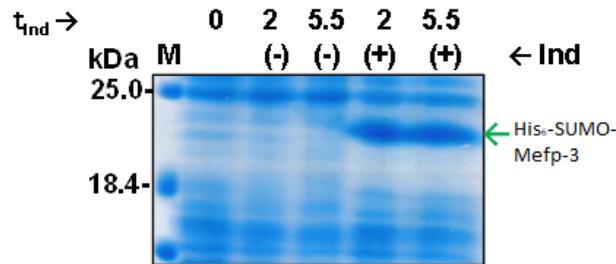
**Abb. 8-4 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse der DP1B-Variante**

MALDI-TOF/TOF-Massenspektrum der DP1B-Variante zur Bestimmung der intakten Proteinmasse (*intact mass analysis*). Die zugehörige detektierte monoisotopische Masse von 34608,109 Da ist hervorgehoben. Die DP1B-Variante besitzt eine theoretische monoisotopische Masse von 34633,14 Da (bestimmt mit dem *Peptide Mass Calculator*). Die Analysen wurden von Dr. Marcel Naumann (Fraunhofer IZI) durchgeführt („*Dried-droplet*“-Präparation mit 70 % DHAP-Matrix, Reflektormodus).



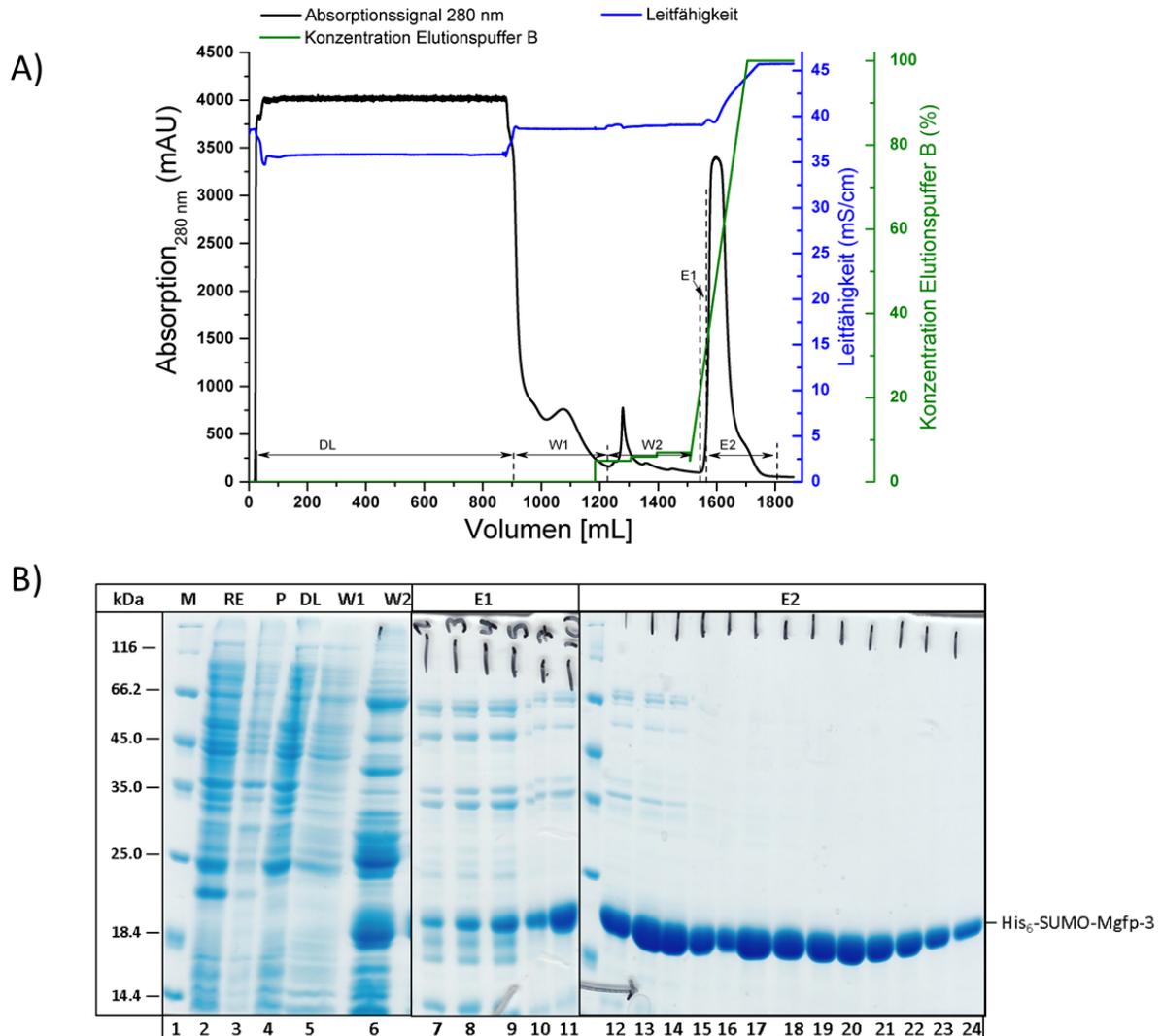


## 8.2 Ergänzende Ergebnisse



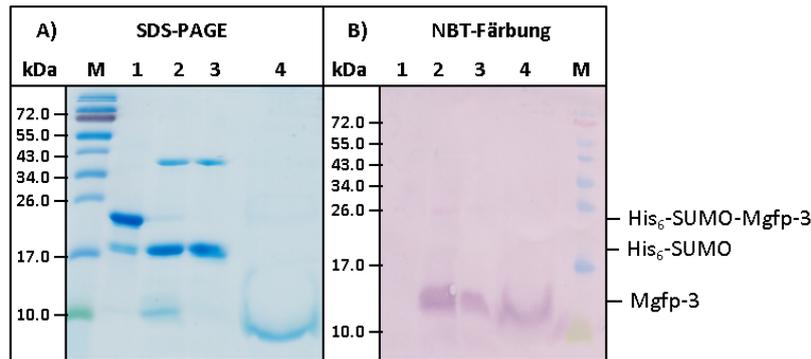
**Abb. 8-7 SDS-PAGE-Analyse der Expression von pET28a\_Mefp3\_SD in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.**

12,5 %iges SDS-PA-Gel der  $1/OD_{600}$ -Proben vor (-) und nach (+) den verschiedenen Induktionszeiten (2 h – 5,5 h). Aufgetragen wurden 10  $\mu\text{L}$  Probe und 5  $\mu\text{L}$  Marker (M, PageRuler™ für SDS-PAGE-Analyse: *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). **Ind**: Induktion (+) oder keine Induktion (-).  $t_{\text{ind}}$ : Zeit nach der Induktion in Stunden. Das Zielprotein His<sub>6</sub>-SUMO-Mefp-3 (→) ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 19,2 kDa). Durch den SUMO-Anteil läuft das Zielprotein bei ca. 24 kDa.



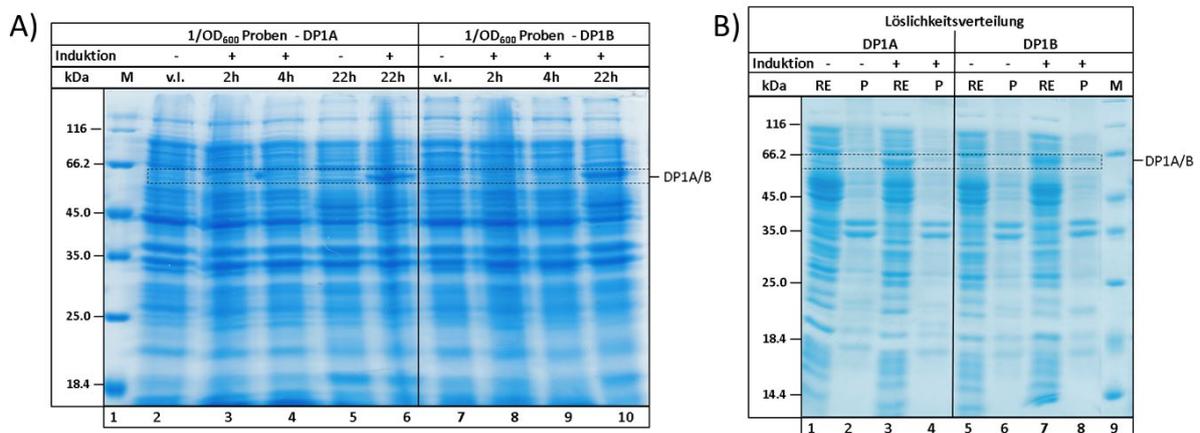
**Abb. 8-8 Chromatografische Reinigung von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS**

A) Chromatogramm der IMAC zur Reinigung der His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3. Absorptionssignal bei 280 nm in mAU (schwarz), Leitfähigkeit in mS/cm (blau) und der Elutionsgradient (Puffer B in %) (grün). Puffer A: 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl (pH 8,0). Puffer B: 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol (pH 8,0). DL – Durchlauf, W1 – Waschfraktion 1, W2 – Waschfraktion 2, E1 – Elutionsfraktion 1 (verunreinigtes Zielprotein), E2 – Elutionsfraktion 2 (reines Zielprotein). B – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der IMAC. M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, DL – Durchlauf, W1 – Waschfraktion 1, W2 – Waschfraktion 2, E1 – vereinte Elutionsfraktion 1 (verunreinigtes Zielprotein), E2 – vereinte Elutionsfraktion 2 (reines Zielprotein). Es wurden 20 µg vom RE und DL, und 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific) aufgetragen. Das Zielprotein His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 19 kDa).



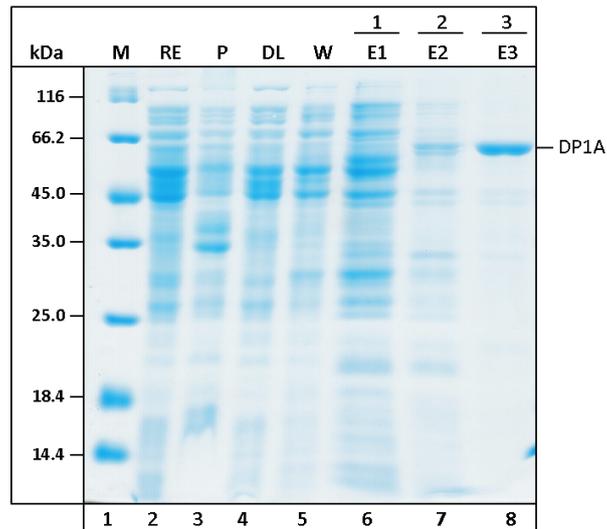
**Abb. 8-9** Enzymatischer Verdau von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 und Modifikation von Mgfp-3 mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase (mTyr)

SDS-PAGE Analyse (A) und NBT-gefärbter Western-Blot (B) vor und nach enzymatischen Verdau von His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 mit der SUMO-Protease für 2 h bei 30 °C und Modifikation von Mgfp-3 mit der mikrobiellen Tyrosinase (mTyr) bei 25 °C für 5 h. 1 – His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 vor SUMO-Abspaltung, 2 – Nach SUMO-Protease Verdau & mTyr Reaktion (*one-pot* Reaktion), 3 – Überstand nach Zentrifugation (enthält His<sub>6</sub>-SUMO & mTyr), 4 – Resolubilisiertes Pellet nach Zentrifugation in 50 % HAC (enthält modifiziertes Mgfp-3). Aufgetragen wurden 3 µg Protein 5 µL Marker (M, PPL *Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific). Die Proteine sind gekennzeichnet: His<sub>6</sub>-SUMO-Mgfp-3 (18,99 kDa), His<sub>6</sub>-SUMO (13,4 kDa) und Mgfp-3 (5,59 kDa).



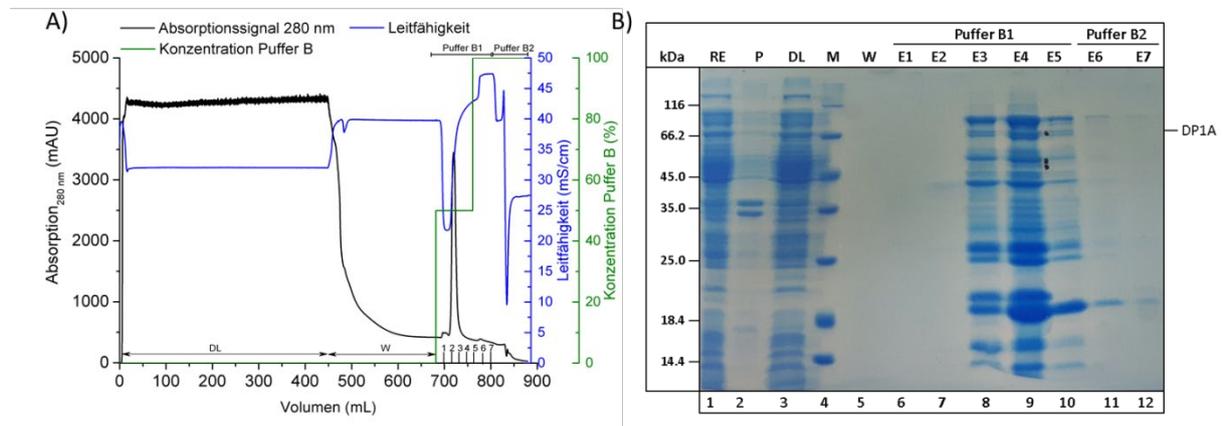
**Abb. 8-10** SDS-PA-Gele zur heterologen Expression von DP1A und DP1B in *E. coli* BW3110 in TB-Medium bei 25 °C und Löslichkeitsverteilung nach Zellaufschluss

A) 12,5 %iges SDS-PA-Gel der 1/OD<sub>600</sub>-Proben vor (-) und nach (+) den verschiedenen Induktionszeiten (2 h – 22 h). Die Kultivierung von *E. coli* BW3110 pJOE\_DP1A und pJOE\_DP1B erfolgte in TB Medium bei 37 °C unter Schütteln. Zur Induktion mit 5 mM Rhamnose wurde die Temperatur auf 25 °C herabgesetzt. Aufgetragen wurden 10 µL Probe und 5 µL Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). M – Marker, v.l. – 1/OD<sub>600</sub> Probe vor Induktion, 2 h – 2 h nach der Induktion, 4 h – 4 h nach der Induktion, 22 h – 22 h nach der Induktion. Es wurden Proben mit und ohne Induktion analysiert: "+" 5 mM Rhamnose und "-" keine Induktion. B) Löslichkeitsverteilung von DP1A und DP1B nach Zellaufschluss in Resuspensionspuffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 1 mM PMSF; pH 8.0) und Zentrifugation: RE – Rohextrakt/Lösliche Fraktion, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet. Aufgetragen wurden 20 µg RE und 5 µL Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). Die Zielproteine DP1A und DP1B sind gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht DP1A: 57,9 kDa; DP1B: 57,4 kDa).



**Abb. 8-11 Chromatografische Reinigung von DP1A aus *E. coli* BW3110**

12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der IMAC (His-Gravi-Traps, GE Healthcare). M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, E1 bis E3 – Elutionsfraktionen. Schritte der Elution: 1 – 500 mM Imidazol, 2 – 1 M Imidazol, 3 – 1 M Imidazol + 6 M Harnstoff. Es wurden 20 µg vom RE und DL, und 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker aufgetragen. Das Zielprotein DP1A ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 57,9 kDa).

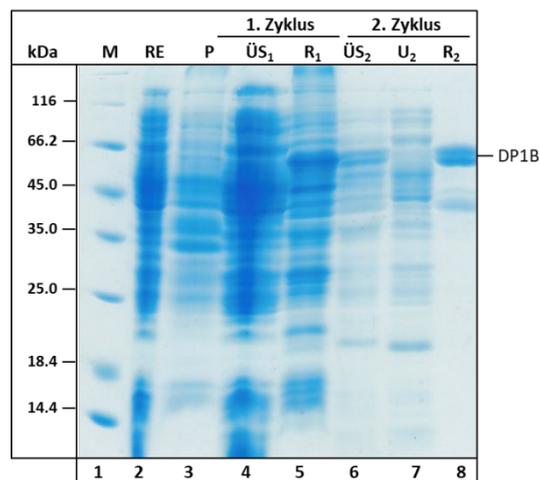


**Abb. 8-12 Chromatografische Reinigung (1. IMAC) von DP1A aus *E. coli* BW3110**

A) Chromatogramm der 1. IMAC zur Reinigung von DP1A. Absorptionssignal bei 280 nm in mAU (schwarz), Leitfähigkeit in mS/cm (blau) und der Elutionsgradient (Puffer B in %) (grün). Puffer: A – 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl (pH 8,0); B1 – 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol (pH 8,0); B2 – 10 mM Tris-HCl, 100 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 1 M Imidazol, 6 M Harnstoff (pH 8,0). DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, 1 bis 7 – Elutionsfraktionen. B – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungsverlauf der 1. IMAC. M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zelltrümmer, DL – Durchlauf, W – Waschfraktion, E1 bis E7 – Elutionsfraktionen. Es wurden 20 µg RE und DL, und 10 µL der anderen Proben (aus einer 1:3 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker aufgetragen. Das Zielprotein DP1A ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 57,9 kDa).

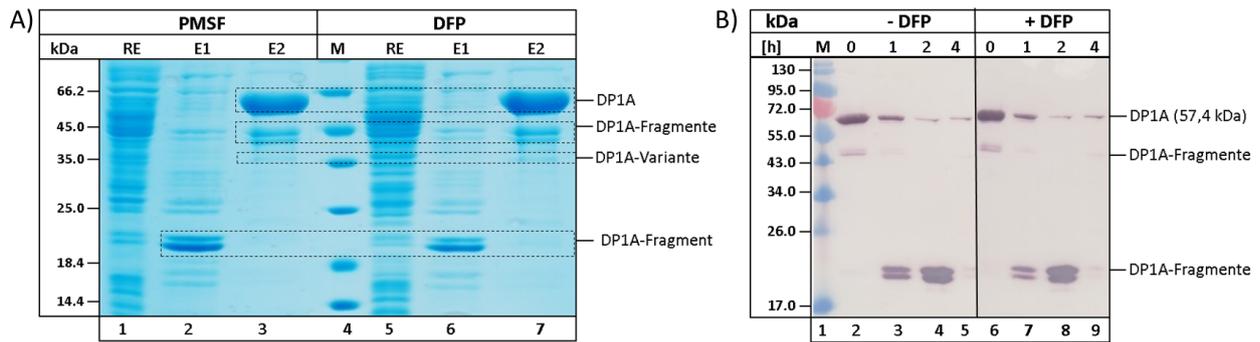
**Tabelle 8-7 Zusammenfassung der Vorversuche zum ITC zur Ermittlung der besten Bedingung für die Reinigung von DP1B. Die Bewertung (+) erfolgte durch die qualitative Analyse der Bandenintensität von DP1B in der SDS-PAGE und im WB. Puffersystem: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TRIS, 300 mM NaCl (pH 8,0).**

Parameter		Bewertung	Beste Bedingung
Übergangs- Temperatur T <sub>t</sub> (°C)	26	+	40°C
	30	++	
	32	++	
	34	+++	
	36	+++	
	40	++++	
KCl-Konzentration (M) im 1. <i>Cycling</i>	0	+	0,5 M KCl
	0,25	++	
	0,5	++++	
	0,75	+++	
	1	++	
KCl-Konzentration (M) im 2. <i>Cycling</i>	0	+++	0,25 M KCl
	0,25	++++	
	0,5	+++	
	0,75	++	
	1	+	
Inkubationsdauer bei T <sub>t</sub> (min)	15	++	20 min
	20	++++	
	40	++++	
Zentrifugationszeit bei T <sub>t</sub> (min)	15	+	40 min (bei 40°C) für vollständigen Übergang von DP1B notwendig
	20	++	
	40	++++	



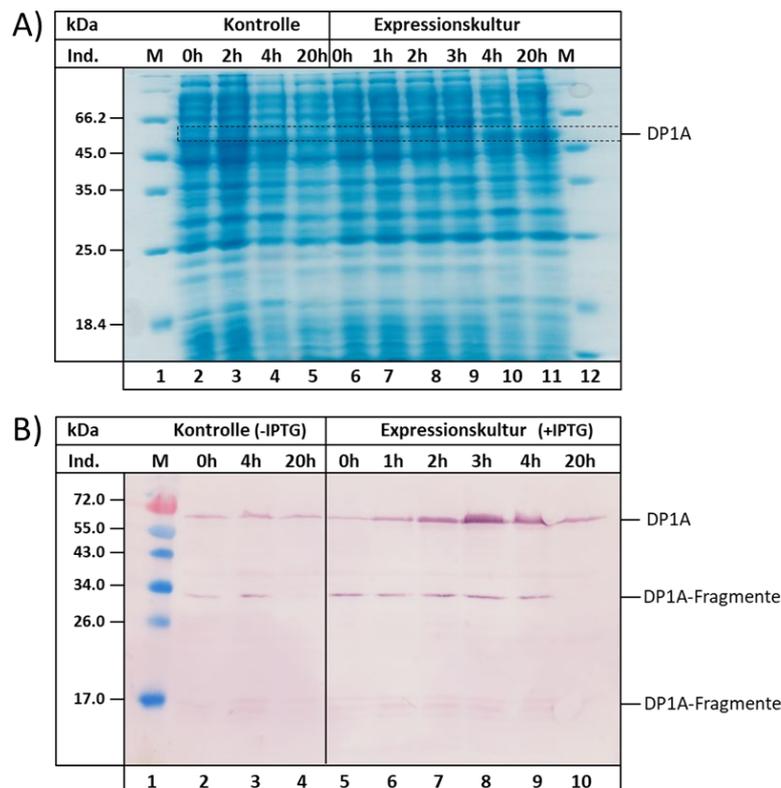
**Abb. 8-13 Reinigung von DP1B aus 1,5 g *E. coli* BW3110 BFM mittels *Inverse transition cycling* (ITC)**

A – 12,5 %iges SDS-PA-Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben aus dem Reinigungs-verlauf des ITC. M - Marker (PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific), RE – Rohextrakt, P – Unlösliche Fraktion/Zellpellet, ÜS<sub>n</sub> – Überstand nach n-ten Zyklus (enthält *E. coli*-eigene Proteine), U<sub>n</sub> – Unlösliche Fraktion nach n-ten Zyklus (enthält *E. coli*-eigene Proteine), R<sub>n</sub> – Re-solubilisiertes Pellet nach n-ten Zyklus (enthält Zielprotein DP1B). Auftragung: 20 µg vom RE und ÜS<sub>n</sub>, 15 µL der anderen Proben (aus einer 1:2 Verdünnung in SDS-PAGE Probenpuffer) und 5 µL Marker. Die Größe des zu erwartenden Zielproteins DP1B ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 57,4 kDa).



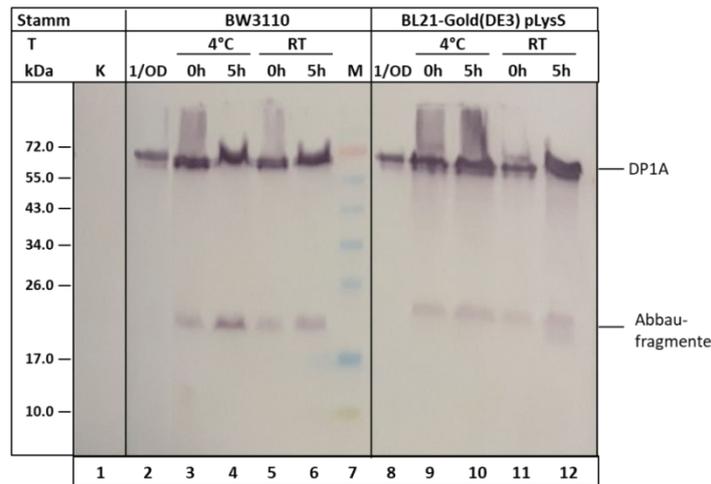
**Abb. 8-14 Testung des Protease-Inhibitors DFP während der chromatografischen Reinigung von DP1A im kleinen Maßstab und Einfluss von DFP auf die Stabilität von DP1A im Rohextrakt**

A) SDS-PAGE-Analyse der Reinigung von DP1A mittels His-Gravity-Columns in Gegenwart von PMSF und Diisopropylfluorophosphat (DFP). B) Western-Blot Analyse des Stabilitätstests von DP1A mit und ohne Zugabe von DFP zum Rohextrakt. RE – Rohextrakt, E1 – Elutionsfraktion 1, E2 – Elutionsfraktion 2, M – Marker. Aufgetragen wurden 5  $\mu$ L Marker, 20  $\mu$ g Rohextrakt und 5  $\mu$ g der Elutionsfraktionen. Das Zielprotein DP1A (theoretisches Molekulargewicht: 57,4 kDa) sowie die Fragmente des Zielproteins sind gekennzeichnet.



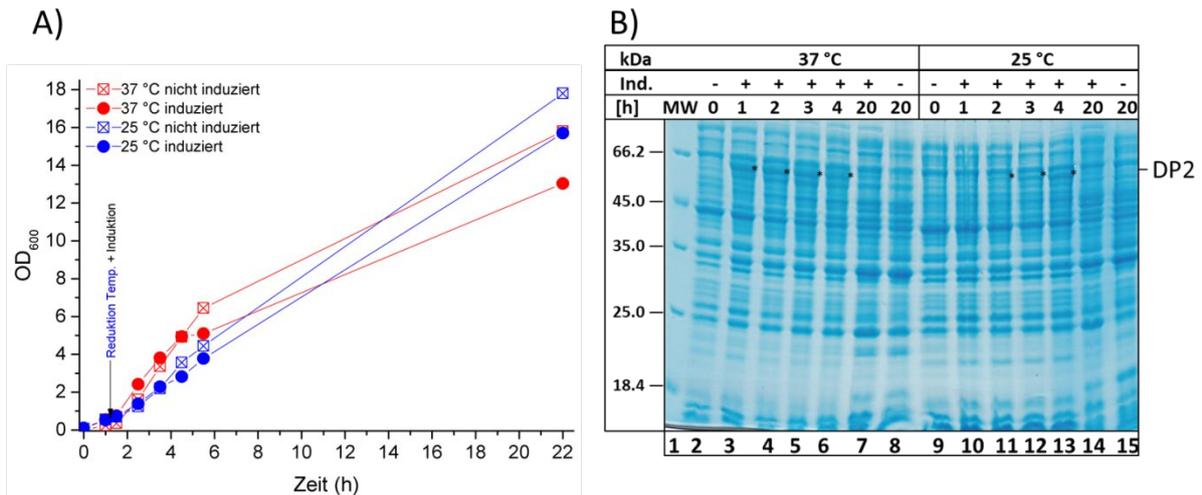
**Abb. 8-15 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP1A im SK in TB-Medium in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS**

A) SDS-PAGE-Analyse. B) Western-Blot Analyse. Untersucht wurden die  $1/OD_{600}$ -Proben ohne (-) und mit (+) IPTG zu den verschiedenen Zeitpunkten (0 h – 20 h). Aufgetragen wurden 10  $\mu$ L Probe und 5  $\mu$ L Marker (M, PageRuler™, Unstained Low Range Protein Ladder oder PPL Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Das Zielprotein DP1A (theoretisches Molekulargewicht: 57,4 Da) sowie die DP1A-Fragmente im WB sind gekennzeichnet.



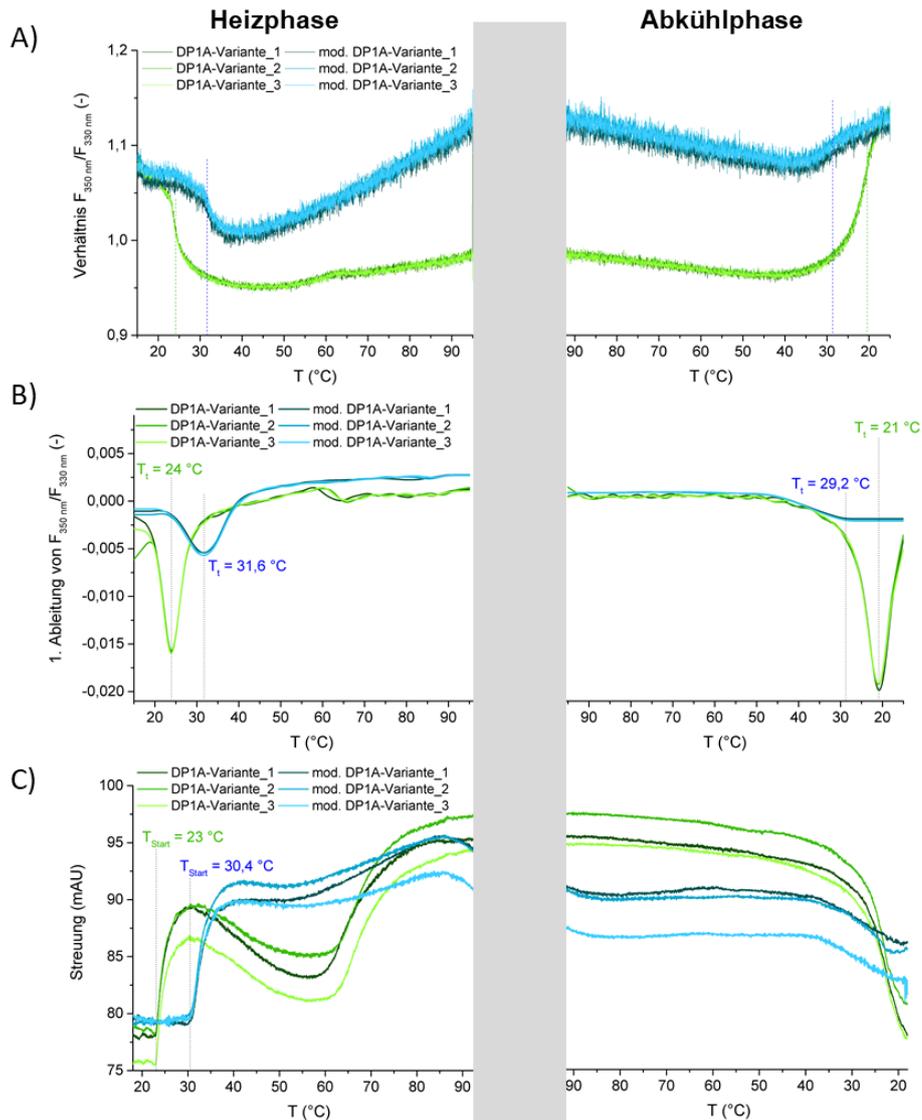
**Abb. 8-16 Untersuchungen des Einflusses des Produktionsstammes auf die Stabilität von DP1A im Rohextrakt nach Zellaufschluss**

Western-Blot Analyse des Stabilitätstests von DP1A produziert in *E. coli* BW3110 und *E. coli* BL21 (DE3) Gold pLysS auf Eis (~ 4 °C) und bei RT im Rohextrakt. 1/OD – 1/OD<sub>600</sub>-Proben zum Zeitpunkt der Zellernte, 0h – RE nach Zellaufschluss, 5h – 5 h Inkubation bei der jeweiligen Temperatur, RT – Raumtemperatur, K – RE aus dem Leerstamm *E. coli* BL21 (DE3) Gold pLysS, M – Marker. Aufgetragen wurden 5 µL Marker, 10 µL der 1/OD-Proben und Rohextrakt (30 µg Proteinmenge). Das Zielprotein DP1A (theor. Molekulargewicht: 57,4 kDa) sowie die Fragmente des Zielproteins sind gekennzeichnet.



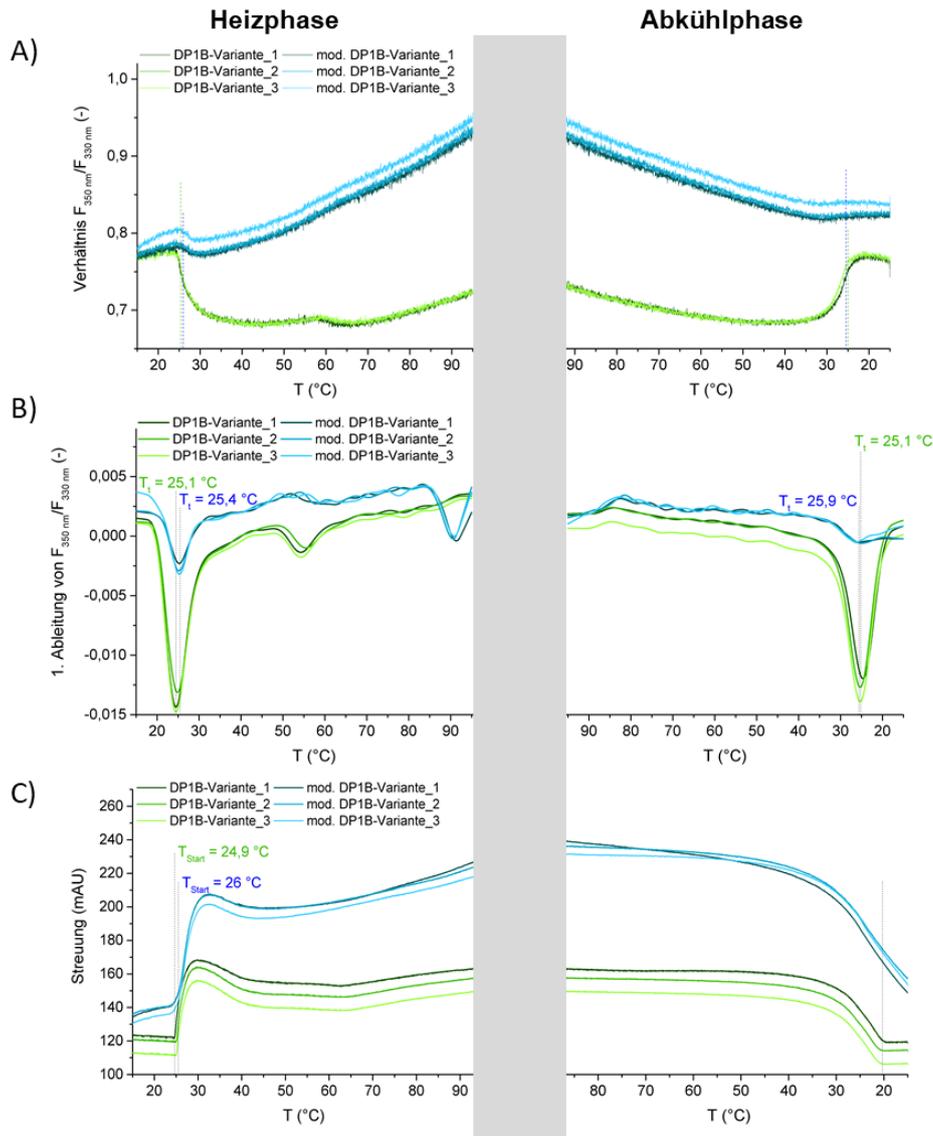
**Abb. 8-17 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP2 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS mit dem Expressionsvektor pET28a\_DP2 (Kan<sup>R</sup>+Cm<sup>R</sup>) bei 25 °C und 37 °C in TB-Medium**

A – Wachstumskurve von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS unter der getesteten Expressionsbedingung in TB-Medium. Genkennzeichnet ist der Zeitpunkt der Temperaturreduktion auf 25 °C. Induktion bei 25 °C (blaue Kurven), Induktion bei 37 °C (rote Kurven). Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde die Induktion mit 1 mM IPTG gestartet. B – SDS-PAGE Analyse der 1/OD<sub>600</sub>-Proben ohne (-) und mit (+) Induktion zu den verschiedenen Zeitpunkten (1 h – 20 h). Aufgetragen wurden 10 µL Probe und 5 µL Marker (M, PageRuler™, *Unstained Low Range Protein Ladder*, Thermo Scientific). Das Zielprotein DP2 ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht: 67,3 kDa).



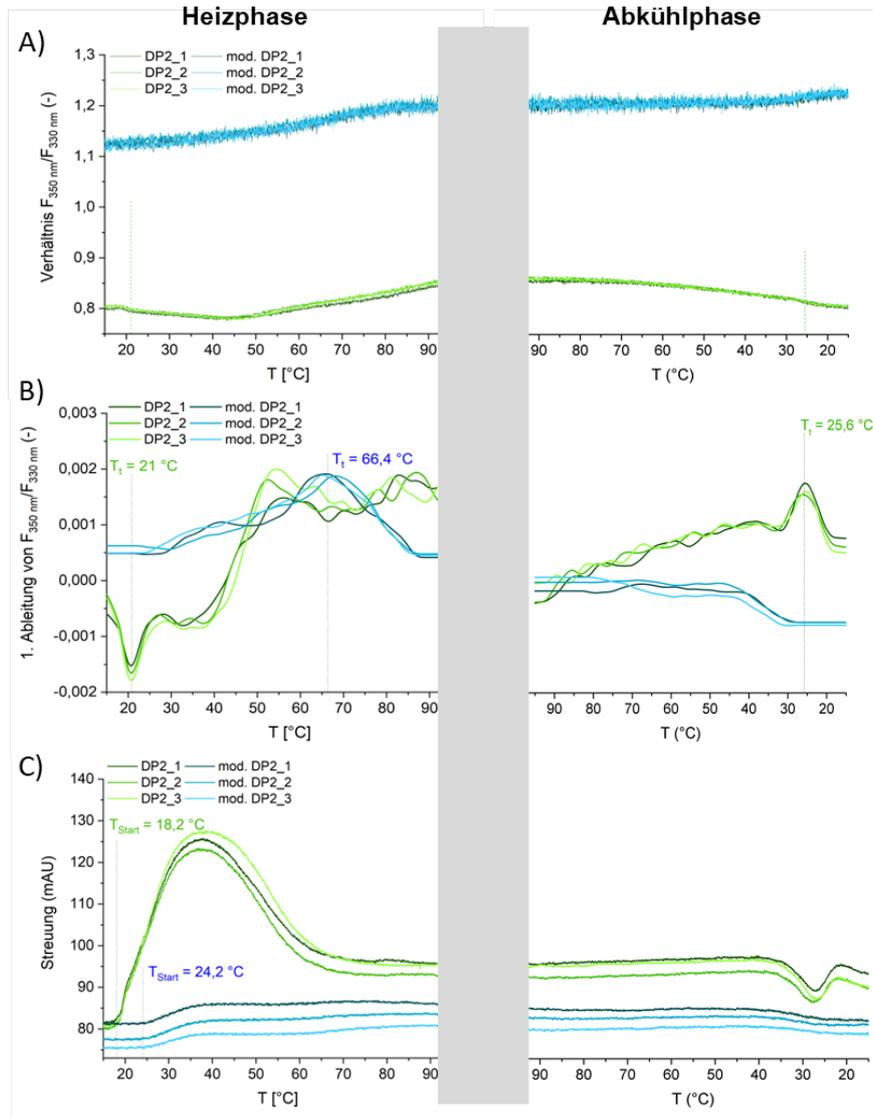
**Abb. 8-18 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1A-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangstemperaturen ( $T_i$ )**

Vergleichend wurde die Veränderung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz der DP1A-Variante (grüne Kurven, s. Legende) und der modifizierten DP1A-Variante (blaue Kurven, s. Legende) analysiert. Untersucht wurde sowohl die Heiz- als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min im ITC-Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0). Für die Messungen wurde eine Anregung von 45 % gewählt. Alle Proben wurden in Triplikaten ( $n = 3$ ) gemessen. A) Aufgetragen ist das Fluoreszenzverhältnis der beiden Wellenlängen ( $F_{350\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$ ) gegen die Temperatur. B) Auftragung der 1. Ableitung aus den erfassten Daten aus A gegen die Temperatur. Aus den lokalen Extrema können die Übergangstemperaturen ( $T_i$ ) ermittelt werden (Angabe der gemittelten  $T_i$  aus  $n = 3$  in der Abb.). C) Auftragung der Streuung in mAU gegen die Temperatur. Daraus lässt sich der Beginn der Aggregation ( $T_{\text{Start}}$ ) ablesen (Angabe der gemittelten  $T_{\text{Start}}$  aus  $n = 3$  in der Abb.). Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).



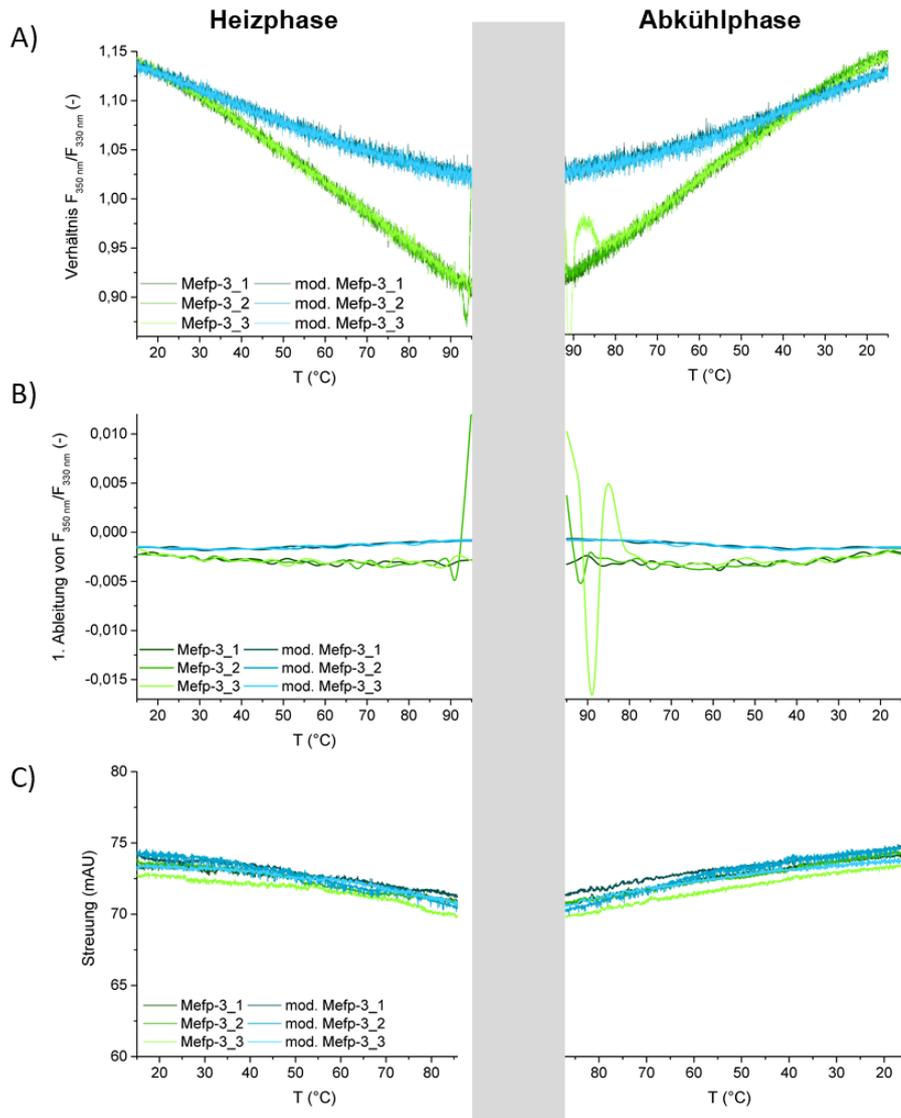
**Abb. 8-19 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1B-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangstemperaturen ( $T_i$ )**

Vergleichend wurde die Veränderung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz der DP1B-Variante (grüne Kurven, s. Legende) und der modifizierten DP1B-Variante (blaue Kurven, s. Legende) analysiert. Untersucht wurde sowohl die Heiz- als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min im ITC-Puffer (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl; pH 8,0). Für die Messungen wurde eine Anregung von 100 % gewählt. Alle Proben wurden in Triplikaten ( $n = 3$ ) gemessen. A) Aufgetragen ist das Fluoreszenzverhältnis gegen die Temperatur. B) Auftragung der 1. Ableitung aus den erfassten Daten aus A gegen die Temperatur. Aus den lokalen Extrema können die Übergangstemperaturen ( $T_i$ ) ermittelt werden (Angabe der gemittelten  $T_i$  aus  $n = 3$  in der Abb.). C) Auftragung der Streuung in mAU gegen die Temperatur. Daraus lässt sich der Beginn der Aggregation ( $T_{\text{Start}}$ ) ablesen (Angabe der gemittelten  $T_{\text{Start}}$  aus  $n = 3$  in der Abb.). Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).



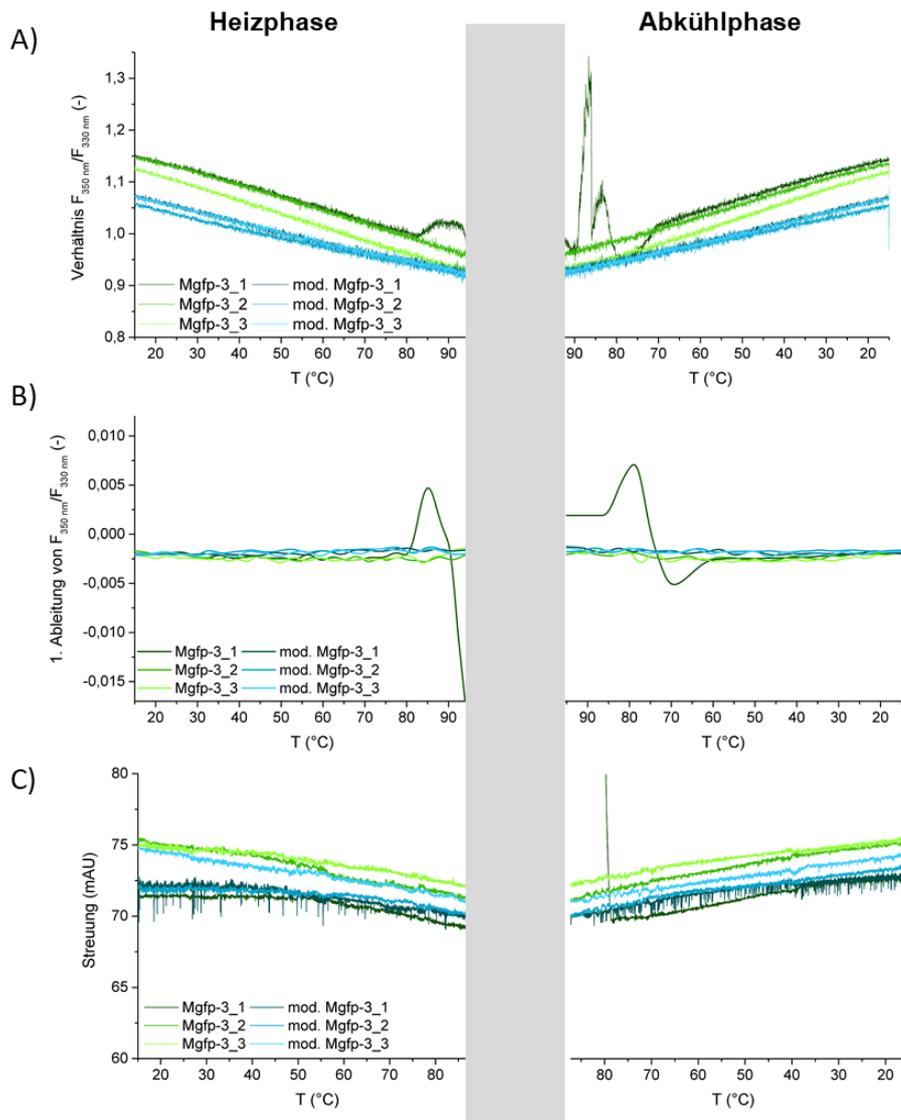
**Abb. 8-20 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs von DP2 (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangstemperaturen ( $T_t$ )**

Vergleichend wurde die Veränderung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz von DP2 (grüne Kurven, s. Legende) und modifiziertem DP2 (blaue Kurven, s. Legende) analysiert. Untersucht wurde sowohl die Heiz- als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min im ITC-Puffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl; pH 8,0). Für die Messungen wurde eine Anregung von 60 % gewählt. Alle Proben wurden in Triplikaten (n = 3) gemessen. A) Aufgetragen ist das Fluoreszenzverhältnis der beiden Wellenlängen ( $F_{350\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$ ) gegen die Temperatur. B) Auftragung der 1. Ableitung aus den erfassten Daten aus A gegen die Temperatur. Aus den lokalen Extrema können die Übergangstemperaturen ( $T_t$ ) ermittelt werden (Angabe der gemittelten  $T_t$  aus n = 3 in der Abb.). C) Auftragung der Streuung in mAU gegen die Temperatur. Daraus lässt sich der Beginn der Aggregation ( $T_{\text{Start}}$ ) ablesen (Angabe der gemittelten  $T_{\text{Start}}$  aus n = 3 in der Abb.). Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).



**Abb. 8-21 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs von Mefp-3 (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF**

Vergleichend wurde die Veränderung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz von Mefp-3 (grüne Kurven, s. Legende) und modifiziertem Mefp-3 (blaue Kurven, s. Legende) analysiert. Untersucht wurde sowohl die Heizphase als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min im ITC-Puffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 mM NaCl; pH 8,0). Für die Messungen wurde eine Anregung von 100 % gewählt. Alle Proben wurden in Triplikaten (n = 3) gemessen. A) Aufgetragen ist das Fluoreszenzverhältnis der beiden Wellenlängen ( $F_{350\text{ nm}}/F_{330\text{ nm}}$ ) gegen die Temperatur. B) Auftragung der 1. Ableitung aus den erfassten Daten aus A gegen die Temperatur. Aus den lokalen Extrema können die Übergangstemperaturen ( $T_t$ ) ermittelt werden. C) Auftragung der Streuung in mAU gegen die Temperatur. Daraus lässt sich der Beginn der Aggregation ( $T_{\text{Start}}$ ) ablesen. Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).



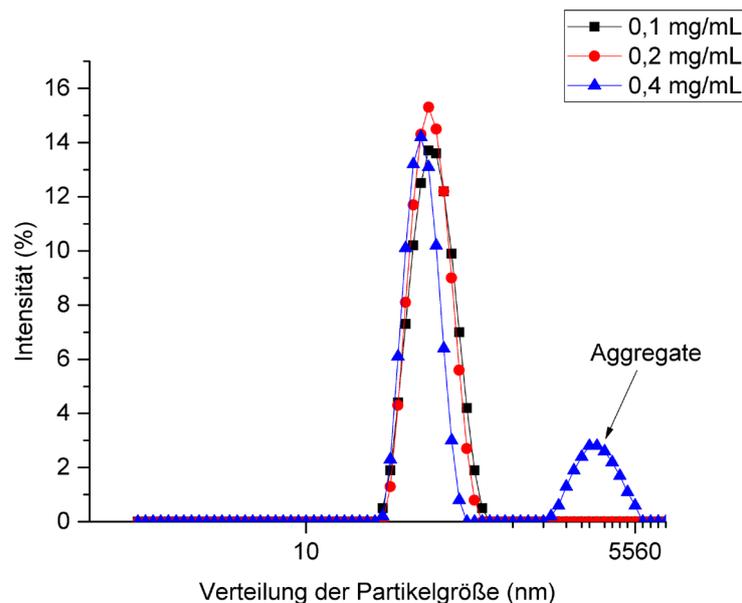
**Abb. 8-22 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs von Mgfp-3 (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF**

Die Messungen erfolgten am nanoDSF-Gerät der Firma NanoTemper Technologies GmbH (Prometheus NT.48). Untersucht wurde sowohl die Heiz- als auch die Abkühlphase im Temperaturbereich von 15 – 95 °C mit einer Temperaturrampe von 1 °C/min. Für die Messungen wurde eine Anregung von 45 % gewählt. Vergleichend ist die Veränderung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz von Mgfp-3 (grüne Kurven, s. Legende) und modifiziertem Mgfp-3 (blaue Kurven, s. Legende) aufgetragen. A) Die Verschiebung der intrinsischen Trp- und Tyr-Fluoreszenz von Mgfp-3 wurde bei zwei Wellenlängen, 330 und 350 nm, aufgenommen. Das Fluoreszenzverhältnis der beiden Wellenlängen wurde gegen die Temperatur aufgetragen. B) Auftragung der 1. Ableitung aus den erfassten Daten aus A gegen die Temperatur. C) Auftragung der Streuung in mAU. Alle Proben wurden in Triplikaten (n = 3) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software „PR.ThermControl“ (NanoTemper Technologies).

**Tabelle 8-8 Zusammenfassung der gemittelten Startfluoreszenzen der Designer-Proteine mittels nanoDSF (engl. *Differential scanning fluorimetry*). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen ( $n = 3$ ). Eingesetzt wurden jeweils 0,2 mg/mL jeder Proteinvariante.**

Protein	Startfluoreszenz bei 330 nm (counts*mm)				Startfluoreszenz bei 350 nm (counts*mm)			
	1	2	3	Ø	1	2	3	Ø
Mefp-3	600,54	601,91	595,22	<b>599,2</b>	683,38	684,94	680,00	<b>682,8</b>
mod. Mefp-3	499,12	499,90	499,10	<b>499,4</b>	568,73	567,74	566,52	<b>567,7</b>
Mgfp-3	904,38	897,80	949,78	<b>917,3</b>	1037,01	1027,96	1068,63	<b>1044,5</b>
mod. Mgfp-3	727,52	754,55	724,70	<b>735,6</b>	778,39	798,14	778,78	<b>785,1</b>
DP1A-Variante	739,35	766,64	750,51	<b>752,2</b>	796,62	830,43	807,93	<b>811,7</b>
mod. DP1A-Variante	256,00	259,21	240,52	<b>251,9</b>	271,76	280,81	258,05	<b>270,2</b>
DP1B-Variante	565,99	593,81	548,91	<b>569,6</b>	434,64	457,24	428,44	<b>440,1</b>
mod. DP1B-Variante	430,42	427,66	275,29	<b>377,8</b>	333,17	328,87	352,21	<b>338,1</b>
DP2	1543,08	1526,33	1515,86	<b>1528,4</b>	1233,07	1224,16	1218,54	<b>1225,3</b>
mod. DP2	189,52	180,51	180,43	<b>183,5</b>	210,73	203,57	201,23	<b>205,2</b>

mod. – modifiziert (Hydroxylierung der Peptid-gebundenen Tyr zu DOPA)

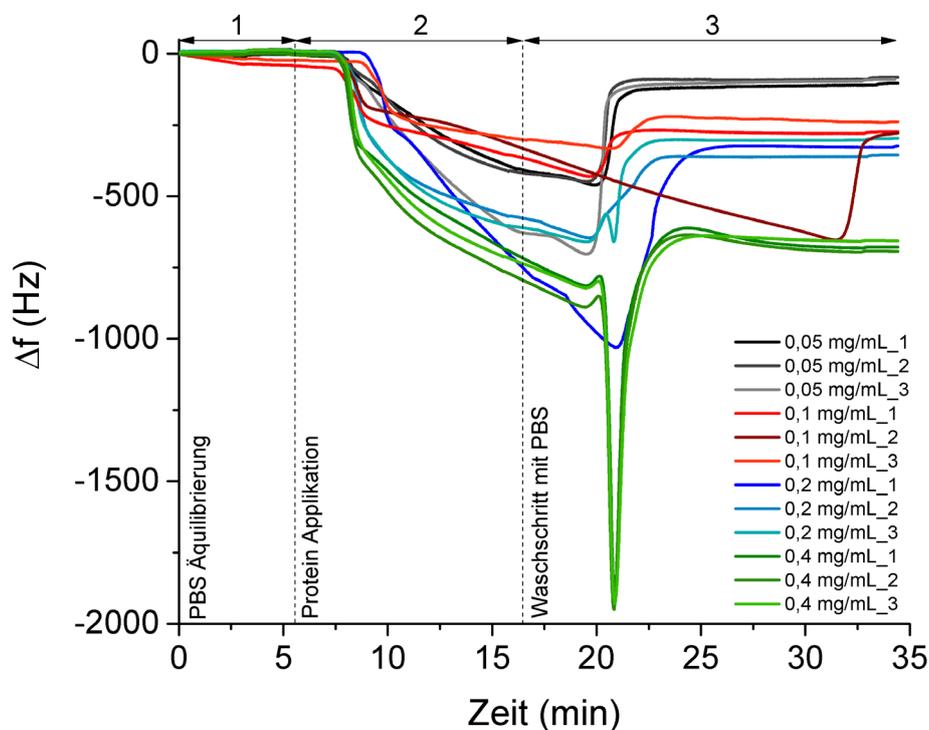


**Abb. 8-23 Einfluss der Proteinkonzentration auf die Verteilung der Partikelgröße der DP1A-Variante**

Die Messungen erfolgten am ZetaSizer Nano ZS (Malverin Instruments) bei 25 °C und wurden mit Eike Busmann (AG Prof. Mäder, MLU Halle) durchgeführt. Das Protein lag in 10-fach verdünntem ITC-Puffer (1 mM Tris-HCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaCl; pH 8.0) vor. Die Messungen in 1-fachen ITC-Puffer waren nicht verwertbar, da die Proteine bereits stark agglomeriert vorlagen und der PDI (Polydispersitätsindex) sehr hoch war. Die Partikelgrößenverteilung (nm) nach der Intensität zeigt, dass die DP1A-Variante bei den untersuchten Proteinkonzentrationen in 10-fach verdünntem ITC-Puffer (0,1 mg/mL – schwarze Kurve; 0,2 mg/mL – rote Kurve und 0,4 mg/mL – blaue Kurve) eine mittlere Partikelgröße  $d_h$  von ca. 105 nm aufweist. Die dargestellten ZetaSizer™-Daten überschneiden sich unabhängig von der eingesetzten Proteinkonzentration nahezu vollständig. Allerdings sind für eine Konzentration von 0,4 mg/mL größere Aggregate unter den Versuchsbedingungen nachweisbar. Die Partikelgröße wurde in drei unabhängigen Messungen untersucht ( $n = 3$ ). Zur besseren Veranschaulichung wird jeweils 1 Kurve pro Konzentration gezeigt. Die Ergebnisse aller Messungen sind in Tabelle 8-9 zusammengefasst.

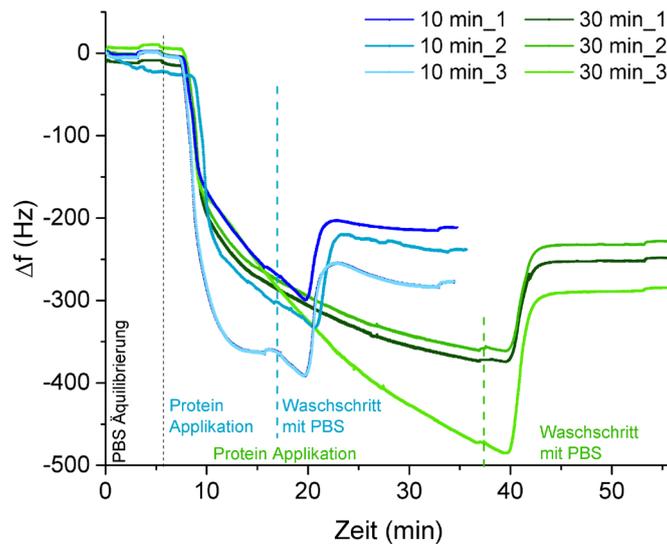
**Tabelle 8-9 Zusammenfassung der Ergebnisse der DLS Messungen am ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) bei 25 °C durchgeführt von Eike Busmann (AG Prof. Mäder, MLU Halle). Das Protein lag in 10-fach verdünntem ITC-Puffer (1 mM Tris-HCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 30 mM NaCl; pH 8.0) vor. Untersucht wurde die Partikelgröße der DP1A-Variante bei folgenden Proteinkonzentrationen: 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL und 0,4 mg/mL. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen (n = 3).**

Konzentration der DP1A-Variante (mg/mL)	0,1			0,2			0,4		
n	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Z-Average (d.nm)	103	101,4	102,6	104,3	104	102,1	110,2	108,6	112,7
PDI (-)	0,199	0,182	0,205	0,165	0,176	0,187	0,338	0,404	0,417
Zeta-Potenzial (mV)	-12,1	-10,4	-9,19	-4,8	-5,41	-6,05	-3,85	-5,59	-4,98
Leitfähigkeit (mS/cm)	8,67	8,98	9,07	5,73	5,95	6,01	5,78	5,98	6,04



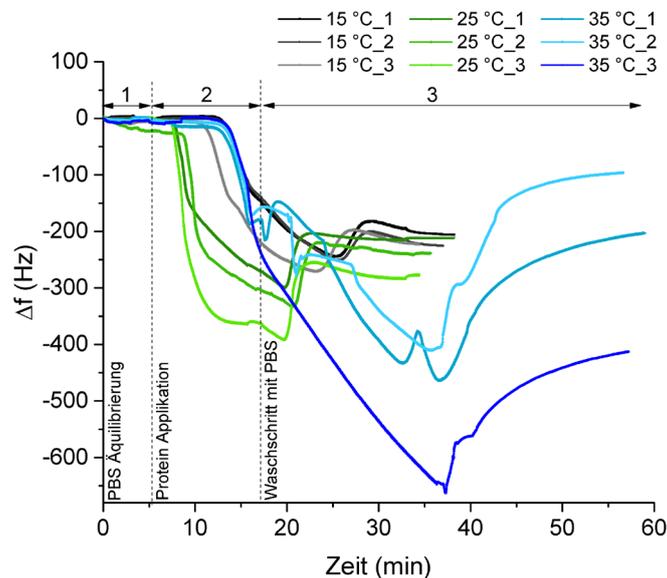
**Abb. 8-24 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Proteinkonzentration der DP1A-Variante während der QCM-Messung**

Frequenzplot zum Vergleich der Proteinadsorption der DP1A-Variante an SiO<sub>2</sub>-Sensoren bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Stammlösung (s. Legende: 0,05 mg/mL – graue Kurven; 0,1 mg/mL – rote Kurven; 0,2 mg/mL – blaue Kurven; 0,4 mg/mL – grüne Kurven). Gezeigt sind die Frequenzplots aus drei unabhängigen Messungen (n = 3). Die Messungen lassen sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibrierung des Sensors mit PBS, 2 – Proteinapplikation, 3 – Finaler Waschschrift mit PBS. Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung. Die Resultate aller Messungen sind Tabelle 3-11 (S. 99) zu entnehmen.



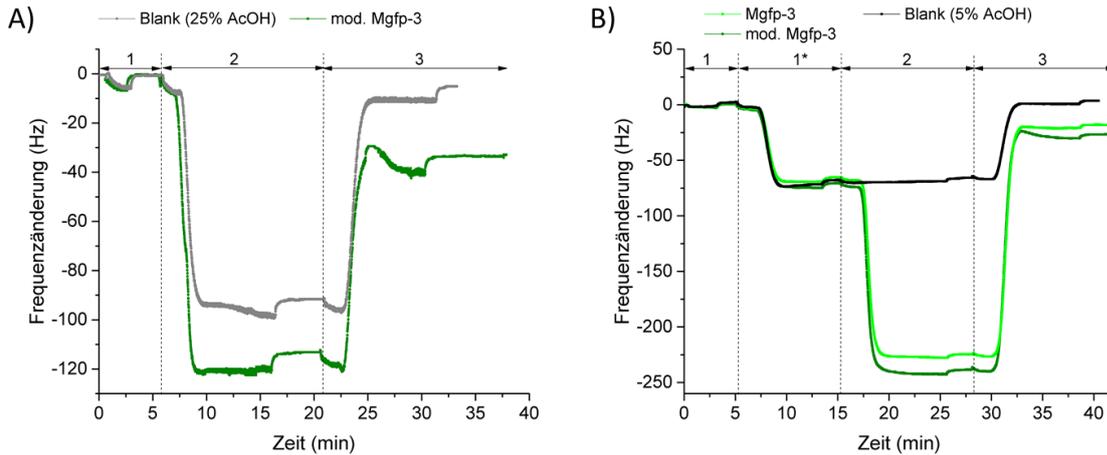
**Abb. 8-25 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Applikationszeit der DP1A-Variante während der QCM-Messung**

Frequenzplot zum Vergleich der Proteinadsorption der DP1A-Variante an  $\text{SiO}_2$ -Sensoren während einer Applikationszeit von 10 min (blaue Kurven) und 30 min (grüne Kurven). Gezeigt sind die Frequenzplots aus drei unabhängigen Messungen (s. Legende,  $n = 3$ ). Die Messungen lassen sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibrierung des Sensors mit PBS (für die beiden Applikationszeiten identisch), 2 – Proteinapplikation (für die beiden Applikationszeiten farblich gekennzeichnet), 3 – Finaler Waschschrift mit PBS (für die beiden Applikationszeiten farblich gekennzeichnet). Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung. Die Resultate aller Messungen sind Tabelle 3-12 (S. 100) zu entnehmen.



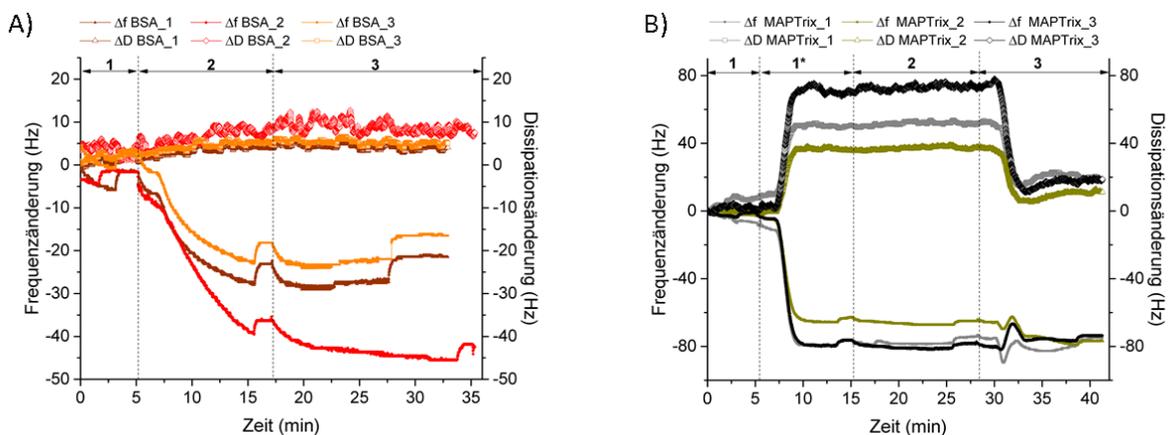
**Abb. 8-26 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Temperatur während der QCM-Messung**

Frequenzplot zum Vergleich der Proteinadsorption der DP1A-Variante an  $\text{SiO}_2$ -Sensoren zu verschiedenen Messtemperaturen: 15 °C (graue Kurven), 25 °C (grüne Kurven) und 35 °C (blaue Kurven). Gezeigt sind die Frequenzplots aus drei unabhängigen Messungen je Temperatur (s. Legende,  $n = 3$ ). Die Messungen lassen sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibrierung des Sensors mit PBS, 2 – Proteinapplikation, 3 – Finaler Waschschrift mit PBS (bis zum Erreichen einer stabilen Frequenz). Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung. Die Resultate aller Messungen sind Tabelle 3-13 (S. 102) zu entnehmen.



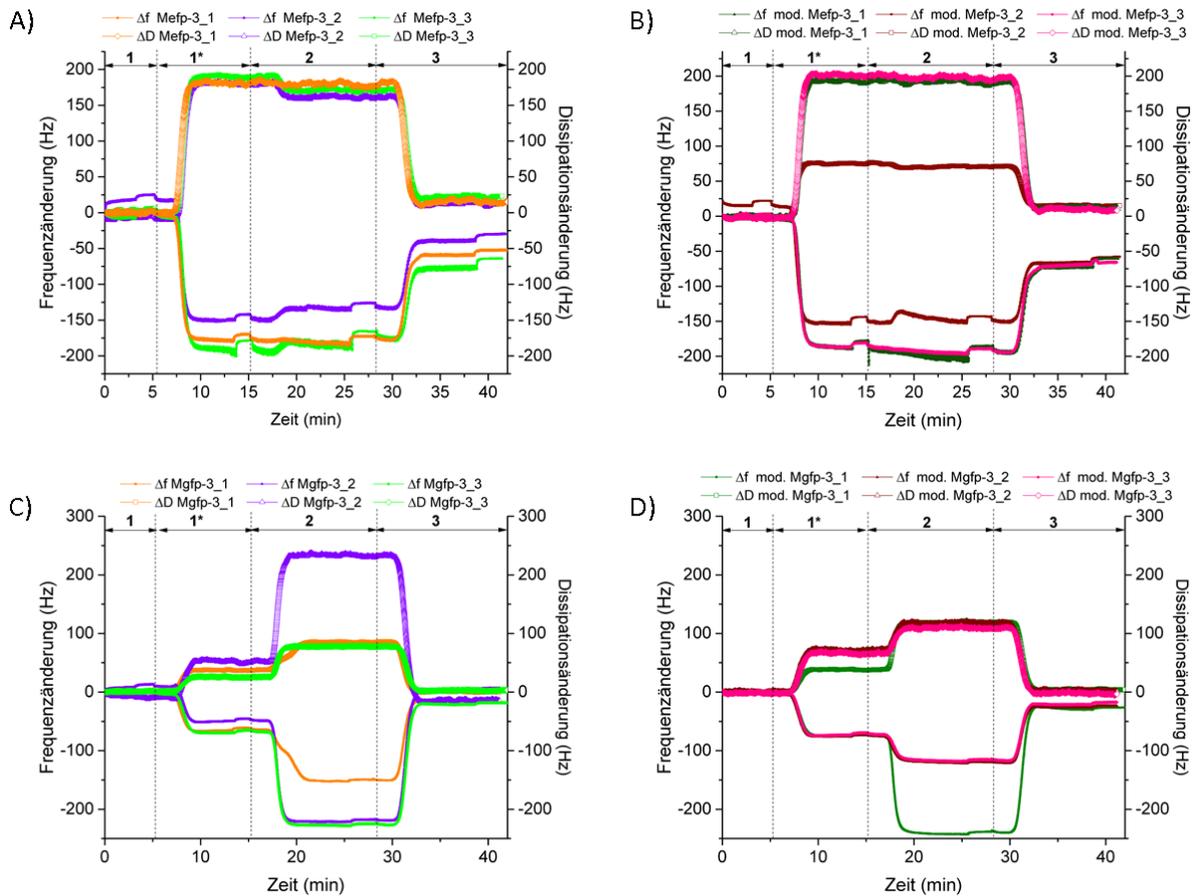
**Abb. 8-27 Untersuchungen zum Einfluss von Essigsäure auf die SiO<sub>2</sub>-Sensoroberfläche während der QCM-Messung**

Frequenzplots zum Vergleich des Einflusses von Essigsäure (HAc) auf die SiO<sub>2</sub>-Sensoroberfläche während der Proteinadsorption von Mgfp-3. A – 25 % HAc, B – 5 % HAc. Die Frequenzplots sind in den entsprechenden Farben dargestellt (s. Legende). Die Messungen lassen sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibriumierung des Sensors mit PBS, 1\* – Äquilibriumierung des Sensors mit 5 % HAc, 2 – Proteinapplikation (Mgfp-3 gelöst in 25 % HAc), 3 – Finaler Waschschritt mit PBS (bis zum Erreichen einer stabilen Frequenz). Die finalen Frequenzänderungen ( $\Delta f$ ) ergeben sich aus der Differenz der Start- und Endfrequenz jeder Messung: A –  $f_{25\% \text{ HAc}} = 4,22 \text{ Hz}$ ;  $f_{\text{mod. Mgfp-3}} = 33,64 \text{ Hz}$ . B –  $f_{5\% \text{ HAc}} = 1,3 \text{ Hz}$ ;  $f_{\text{Mgfp-3}} = 19,61 \text{ Hz}$ ;  $f_{\text{mod. Mgfp-3}} = 27,37 \text{ Hz}$ .



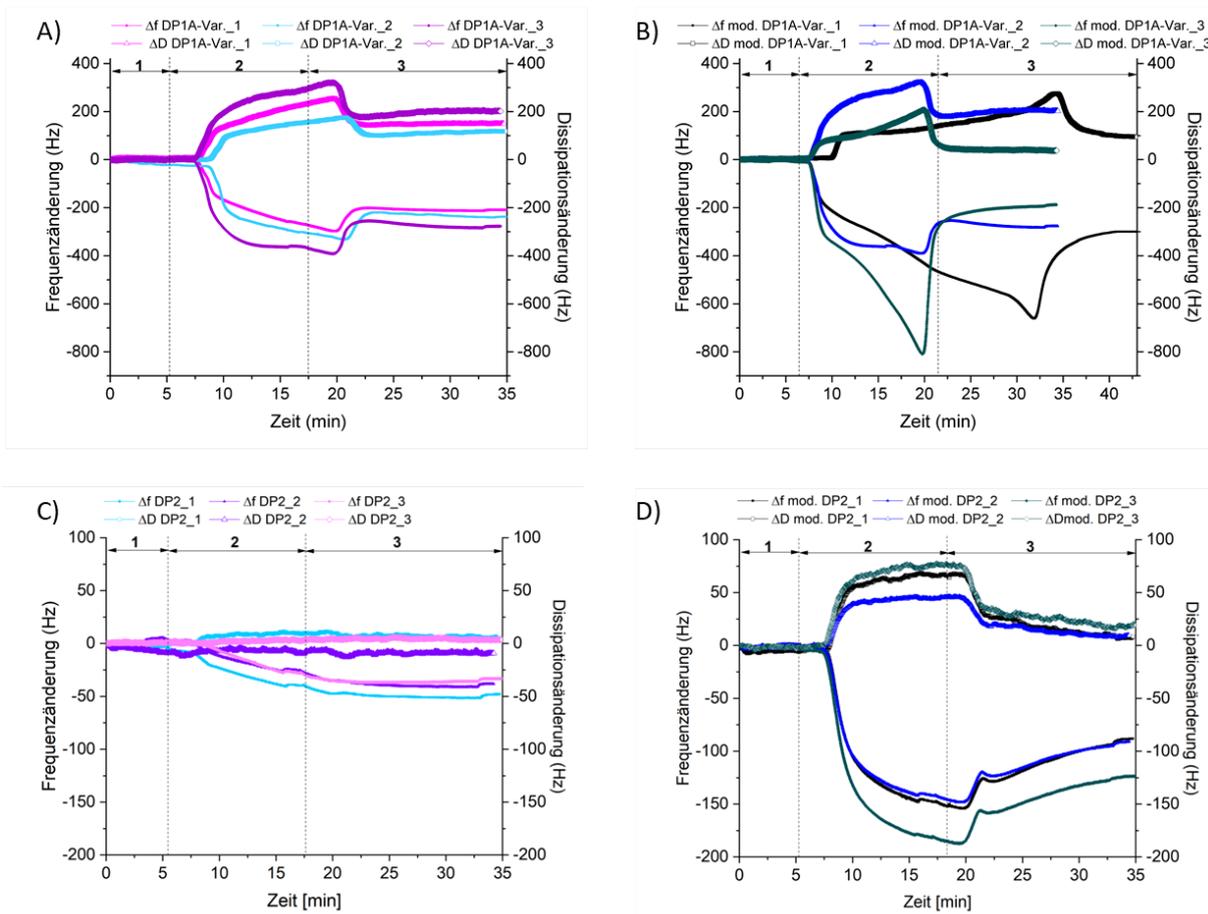
**Abb. 8-28 Dissipationsverhalten der Kontrollen BSA und MAPTriX™ an eine SiO<sub>2</sub>-Sensoroberfläche**

Dissipationsverhalten ( $\Delta D$ ) der Kontrollen zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften während einer Applikationszeit von 10 min, einer Flussrate von 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei 25 °C. A – Negativkontrolle BSA, B – Positivkontrolle MAPTriX™. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt ( $n = 3$ ). Die Frequenz- und Dissipationsplots sind in den entsprechenden Farben dargestellt (s. Legende). Die Messung lässt sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibriumierung des Sensors mit PBS, 1\* – Äquilibriumierung des Sensors mit 5 % HAc bei MAPTriX™, 2 – Proteinapplikation, 3 – Finaler Waschschritt mit PBS.



**Abb. 8-29** Dissipationsverhalten der Muschelfußproteine Mefp-3 und Mgfp-3 an eine  $\text{SiO}_2$ -Sensoberfläche

Vergleichend ist das Dissipationsverhalten ( $\Delta D$ ) der adhäsiven Einzelblöcke Mefp-3 und Mgfp-3 zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften während einer Applikationszeit von 10 min, einer Flussrate von  $60 \mu\text{L}/\text{min}$  bei  $25^\circ\text{C}$  gezeigt. A – Mefp-3, B – mod. Mefp-3, C – Mgfp-3, D – mod. Mgfp-3. Die jeweilige modifizierte Proteinvariante (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase) wurde ebenfalls untersucht und ist in einem Frequenzplot mit gleicher Skalierung dargestellt. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt ( $n = 3$ ). Die Frequenz- und Dissipationsplots sind in den entsprechenden Farben dargestellt (s. Legende). Die Messung lässt sich in vier Schritte unterteilen: 1 – Äquilibrierung des Sensors mit PBS, 1\* – Äquilibrierung des Sensors mit 5 % HAc, 2 – Proteinapplikation, 3 – Finaler Waschschritt mit PBS.



**Abb. 8-30** Dissipationsverhalten der Designer-Proteine DP1A-Variante und DP2 an eine SiO<sub>2</sub>-Sensoroberfläche

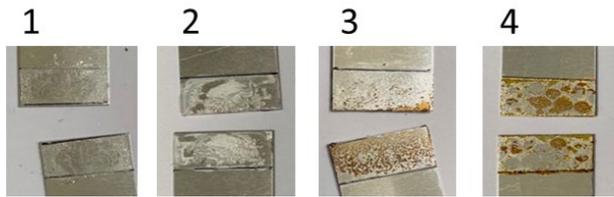
Vergleichend ist das Dissipationsverhalten ( $\Delta D$ ) der Designer-Proteine zur Bestimmung der viskoelastischen Eigenschaften während einer Applikationszeit von 10 min, einer Flussrate von 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  bei 25 °C gezeigt. A – DP1A-Variante, B – mod. DP1A-Variante, C – DP2, D – mod. DP2. Die jeweilige modifizierte Proteinvariante (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase) wurde ebenfalls untersucht und ist in einem Frequenzplot mit gleicher Skalierung dargestellt. Es wurden drei unabhängige Messungen durchgeführt ( $n = 3$ ). Die Frequenz- und Dissipationsplots sind in den entsprechenden Farben dargestellt (s. Legende). Die Messung lässt sich in drei Schritte unterteilen: 1 – Äquilibration des Sensors mit PBS, 2 – Proteinapplikation, 3 – Finaler Waschschritt mit PBS.

**Tabelle 8-10** Bestimmung der Trockenmasse Elmers Glue

Zur Bestimmung der Trockenmasse von Elmers Glue wurden 40  $\mu\text{L}$  mit einer Verdrängungspipette in Glasfläschchen aufgetragen, auf einer analytischen Waage gewogen, 24 h lang bei 90 °C und 15 % Luftfeuchtigkeit getrocknet und erneut gewogen. Die vorbereiteten Glasfläschchen wurden zuvor mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und 2 h lang vorinkubiert, um die Feuchtigkeit zu entfernen.

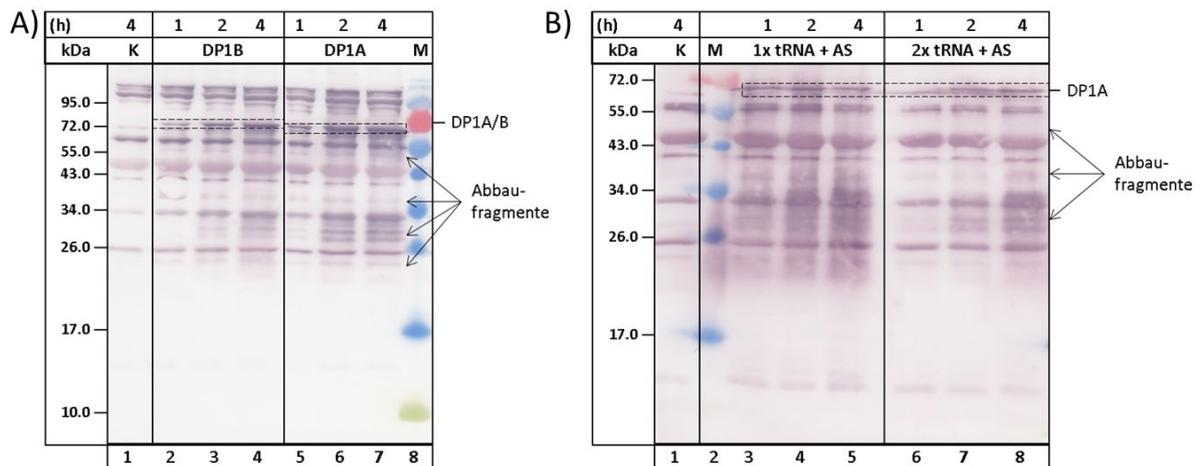
Probe	Feuchtmasse	Trockenmasse	$\Delta$	Anteil Trockenmasse (%)	Feuchtigkeit (%)
1	43,70	16,10	27,60	36,84	63,16
2	41,70	15,40	26,30	36,93	63,07
3	42,00	15,50	26,50	36,90	63,10
4	42,20	16,30	25,90	38,63	61,37
5	42,50	17,30	25,20	40,71	59,29
Mittelwert	42,42	16,12	26,30	38,00	62,00

SD	0,77	0,76	0,88	1,69	1,69
----	------	------	------	------	------



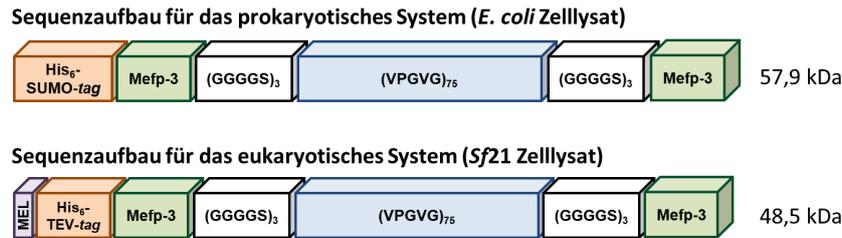
**Abb. 8-31 Bruchbilder nach den Zug-Scher-Versuchen an Al-Oberflächen**

Neben der Zug-Scher-Festigkeit liefert der Verlauf des Bruches wichtige Informationen zur Verklebung der Prüfkörper (Aluminium-Oberfläche). Dabei unterscheidet man im Allgemeinen zwischen einem Bruch in der Klebstoffmasse (Kohäsionsbruch) und Bruch zwischen Klebstoff und Füge teil (Adhäsionsbruch). Dargestellt sind die Bruchbilder der folgenden Proben: 1 – BSA, 2 – Elmers Glue, 3 – Mefp-3, 4 – mod. Mefp-3.



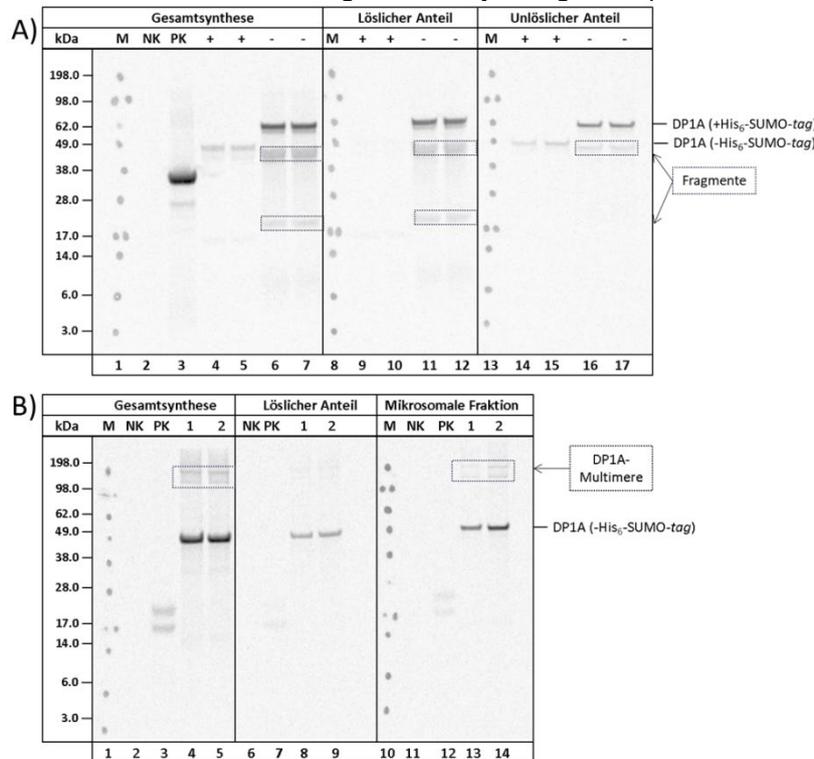
**Abb. 8-32 Western-Blot-Analyse der zellfreien Proteinsynthese (CFPS) von DP1A und DP1B**

A) Ergebnisse der CFPS von DP1A und DP1B mittels PURExpress® Kit. B) Ergebnisse der CFPS von DP1A mittels PURExpress®  $\Delta$  (aa, tRNA) Kit, 1x tRNA+AS – Zugabe der einfachen Menge an tRNAs und Aminosäuren zum Reaktionsansatz, 2x tRNA+AS – Zugabe der zweifachen Menge an tRNAs und Aminosäuren zum Reaktionsansatz. Analysiert wurde die zellfreie Proteinsynthese über einen Zeitraum von 1 h – 4 h bei 37 °C nach Herstellerangaben. Die Negativ-Kontrolle (K) enthält alle Komponenten der Kits ohne Zugabe der Plasmide, die die Geninformationen der Zielproteine DP1A/B enthalten. The PURExpress® Komponenten besitzen bis auf die ribosomalen Proteine einen His-tag und sind in der Negativ-Kontrolle sichtbar. Aufgetragen wurden 10  $\mu$ L des Reaktionsansatzes und 5  $\mu$ L Marker (M, PPL, *Prestained Protein Ladder*, Thermo Scientific). Die Zielproteine DP1A und DP1B sind gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht DP1A: 57,9 kDa; DP1B: 57,4 kDa). Zusätzlich sind die Bereiche gekennzeichnet, in denen Abbaufragmente der Zielproteine detektiert wurden.



**Abb. 8-33 Schematische Darstellung der Proteinsequenzen für die Zell-freie Proteinsynthese von DP1A im prokaryotischen und eukaryotischen System**

Das Designer-Protein 1A (DP1A) besteht aus vier Protein-Blöcken des in Kap. 1.3 (S. 9) vorgestellten Baukastensystems: *tag*-Sequenz (orange), Linker-Sequenz (weiß), adhäsiver Block (grün) und kohäsiver Block (blau). DP1A enthält Mefp-3 als adhäsiven Block und ELP-Sequenzen als kohäsive Einheit. Zusätzlich wurde für die zellfreie Proteinsynthese im *Sf21* System N-terminal eine Melittin-Signalsequenz (MEL) eingebracht, die eine Translokation des Zielproteins in das Lumen der Mikrosomen hervorruft. SUMO – engl. *Small Ubiquitin-related MOdifier*, Mefp-3 – Muschelfußprotein-3 aus *M. edulis*, (VPGVG)<sub>75</sub> – ELP-Sequenz, ELP – Elastin-ähnliche Polypeptide, TEV – TEV-Schnittstelle (engl. *tomato etch virus*). Das theoretische Molekulargewicht der jeweiligen Sequenzvariante ist mit aufgeführt.



**Abb. 8-34 Zellfreie Synthese (CFPS) von DP1A im *E. coli* System (A) und *Sf21* System (B)**

Dargestellt sind die Autoradiogramme der CFPS von <sup>14</sup>C-Val markierten DP1A im prokaryotischen *E. coli* System (A) und eukaryotischen *Sf21* System (B). A) Aufgetragen sind die Proben der Gesamtsynthese, sowie der lösliche und unlösliche Anteil in der CFPS im *E. coli* System. Reaktionsbedingungen: 37 °C für 4 h (n = 2). Die Synthesen erfolgten zum einen in Gegenwart der SUMO-Protease (+) als auch ohne SUMO-Protease (-) für die Produktion des volllängeren Proteins. NK – Negativ Kontrolle (Reaktionsansatz ohne DNA-*template*), PK – Positiv Kontrolle (Mel-vtPA, 41 kDa). Das Zielprotein DP1A ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht DP1A (+His<sub>6</sub>-SUMO-*tag*): 57,9 kDa; DP1A (-His<sub>6</sub>-SUMO-*tag*): 48,5 kDa). Zusätzlich sind die Bereiche hervorgehoben, in denen Abbauprodukte detektiert wurden. B) Aufgetragen sind die Proben der Gesamtsynthese, sowie der lösliche Anteil und die Mikrosomale Fraktion der CFPS im *Sf21* System. Reaktionsbedingungen: 27 °C für 2 h (n = 2). NK – Negativ Kontrolle (Reaktionsansatz ohne DNA-*template*), PK – Positiv Kontrolle (Mel-Erythropoetin, glykosyliert: 19,7 kDa). Das Zielprotein DP1A ist gekennzeichnet (theoretisches Molekulargewicht DP1A (-His<sub>6</sub>-SUMO-*tag*): 48,5 kDa). Zusätzlich sind die Bereiche markiert, in denen DP1A-Multimere detektiert wurden.



Protein-Blöcke	Herkunft	Aminosäuresequenz	Rekombinante Produktion	Ausbeute	Literatur
		PLGYPIKAPKLPGGYGLPYTTGKLPYGYGPGGVAGAAGKAGYPTGTGVGPQAAAAAAAAKA AAKFGAGAAGVLPVGGAGVPGVPGAIPGIGGIAGVGTAAAAAATAAKAAYGAAAGLV PGGPGFGPGVVGVPGAGVPGVPGAGIPVVPAGIPGAAVPGVVSPEAAKAAKAAKY GARPGVGVGGIPTYGVGAGGFPGFVGVGGIPGVAGVPSVGGVPGVGGVPGVGSPEAQ AAAAKAAKYGVGTAAAAAATAAKAAQFGLVPGVGVAPGVGVAPGVGVAPGVGLAPGVG VAPGVGVAPGVGVAPGIGPGGVAAAAKSAKVAAKAAQLRAAAGLGAGIPGLGVGVGPGL GVGAGVPGLVGAGVPGFVAVPGALAAKAAKYGAAVPGVLGGLGALGGVGPVGGVGA GPAAAAAATAAKAAQFGLVGAAGLGGLVGGVPGVGGVGGIPVAAAAKAAKYGAAG LGGVLGGAGQFPLGGVAARPGFGLSPIFPGGACLGKACGRKRK			
RLPs	<i>D. melanogaster</i>	GGRPSDSYGAPGGGNGGRPSDSYGAPGQQGQGGQGGYAGKPSDTYGAPGGGNGN GGRPSSSYGAPGGGNGGRPSDTYGAPGGGNGGRPSDTYGAPGGGNGGGRPSSSYG APGQQGNGNGRSSSYGAPGGGNGGRPSDTYGAPGGGNGGRPSDTYGAPGGGNGG GRPSSSYGAPGGGNGGRPSDTYGAPGGGNGNGSGGRPSSSYGAPGQQGGFGGRPSD SYGAPGQNQKPSDSYGAPGSGNGNGGRPSSSYGAPGSGPGGRPSDSYGPPASGS	<i>E. coli</i>	k.A.	[Qin et al., 2011]
CLPs	<i>H. sapiens</i>	GAGAPGEPGNPSPGNQGGQPGNKGSPGNPQPGNEGQPGQPGQNGQPGEPSNGPQ GSQGNPKNQPGSPGSQGSQGNQGGSPGNQGGSPGNPQPGQPGQNGQPGEQKPGNQGPPAGEPNP PGNQQQPGNKGSPGNPQPGNEGQPGQPGQNGQPGEPSNGPQGSQGNPKNQPG SPGSQGSQGNQGGSPGNPQPGQPGQNGQPGEQKPGNQGPPAGE	<i>P. pastoris</i>	0,8 – 1,6 g/L	[Martens et al., 2009a; Martens et al., 2009b]
SLPs	<i>B. mori</i>	GAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEG AGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGA GAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAG AGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGA GAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAG AGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGA GEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGEGAGAGAGE	<i>P. pastoris</i>	0,8 – 1,6 g/L	
Leucin-Zipper	synthetisiert	SGDLENEVAQLEREVRSLEDEAAELEQKVSRLKNEIEDLKAE	<i>E. coli</i>	10 – 15 mg/L	[Shen et al., 2007]

Protein-Blöcke	Herkunft	Aminosäuresequenz	Rekombinante Produktion	Ausbeute	Literatur
<b>Linker Blöcke</b>					
1	synthetisiert	(GGGGS) <sub>3</sub>	wird nicht einzeln betrachtet		[Chen et al., 2013]
2	synthetisiert	(GGGGS) <sub>2</sub>			
3	synthetisiert	(GGGGS) <sub>1</sub>			
<b>Protein-tags</b>					
His <sub>6</sub> -SUMO-tag		HHHHHHGSLVPRGSASMSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIFFKIKKTTPL RRLMEAFKRQGKEMDSLRFYDGIRIQADQTPEDLDMEDNDIIEAHREQIGG	wird nicht einzeln betrachtet		[Malakhov et al., 2004]
c-myc-tag	synthetisiert	EQKLISEEDL			[Evan et al., 1985]

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Reaktion von Harnstoff mit Formaldehyd zur Herstellung von UF-Harz [Pizzi et al., 2020].....	2
Abb. 1-2 Allgemeines Prinzip eines guten Klebstoffs modifiziert nach [Industrie, 2001] .....	3
Abb. 1-3 Schematische Darstellung des Proteinsequenzraums modifiziert nach [Huang et al., 2016] ..	4
Abb. 1-4 Mögliche Einteilung von <i>repeat</i> -Proteinen basierend auf der Länge ihrer Wiederholungen nach [Kajava, 2012].....	6
Abb. 1-5 Möglichkeiten für das Design von Bio-inspirierten Materialien durch Gentechnik modifiziert nach [Dinjaski und Kaplan, 2016].....	7
Abb. 1-6 Oberflächenchemie von Siliciumdioxid (SiO <sub>2</sub> ), modifiziert nach [Coyle und Baneyx, 2014] ....	9
Abb. 1-7 Übersicht zu bekannten Protein-Blöcken aus der Literatur .....	10
Abb. 1-8 Schematische Übersicht zur Adhäsion der Muschel an eine Oberfläche, modifiziert nach [Lee et al., 2011; Rev.; Waite, 2017] .....	13
Abb. 1-9 Sequenz- <i>Alignment</i> von Mefp-3f aus <i>Mytilus edulis</i> und Mgf-3 aus <i>Mytilus galloprovincialis</i> auf Proteinebene .....	15
Abb. 1-10 Vielfalt der DOPA-Chemie für die Adhäsion modifiziert nach [Rev.; Waite, 2017].....	16
Abb. 1-11 Reaktionsgleichungen der Tyrosinase-katalysierten <i>o</i> -Hydroxylierung von Monophenol zu Brenzcatechin, kurz Catechol (A) und der Oxidation von <i>o</i> -Catechol zu 1,2-Benzochinon (B) [Pretzler et al., 2017]. R = H oder andere Substituenten.....	17
Abb. 1-12 Reversibler Temperaturübergang bei ELP von einer relativ unstrukturierten Anordnung ( <i>random-coil</i> ) zu inter- & intramolekularen Interaktionen (hoch dehnbare Spiralketten) unter physiologischen Bedingungen (T = 37 °C) [Desai et al., 2016].....	20
Abb. 1-13 Schematische Darstellung der ELP-basierten Proteinaufreinigung durch ITC [Meyer und Chilkoti, 2002].....	21
Abb. 2-1 Umwandlung von L-Tyrosin in L-DOPA und L-Dopachinon, katalysiert durch Tyrosinase [Agunbiade und Roes-Hill, 2022].....	46
Abb. 2-2: Reaktionsmechanismus von NBT mit Superoxid zur Bildung von NBT-Formazan und zweiatomigem Sauerstoff modifiziert nach [Bakr und Rahaman, 2016] .....	47
Abb. 3-1 Modularer Aufbau der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Designer-Proteine (DP) .....	51
Abb. 3-2 SDS-PA-Gel der Produktion von His <sub>6</sub> -mTyr in <i>E. coli</i> KRX in TB-Medium bei 30 °C.....	54
Abb. 3-3 Chromatografische Reinigung von His <sub>6</sub> -mTyr aus <i>E. coli</i> KRX .....	54
Abb. 3-4 Nachweis der enzymatischen Aktivität der mikrobiellen Tyrosinase (His <sub>6</sub> -mTyr) und der Pilz-Tyrosinase im Sigma-Assay .....	57
Abb. 3-5 NBT-Färbung zum qualitativen Nachweis der Aktivität der Tyrosinasen .....	58
Abb. 3-6 Ergebnisse zur heterologen Produktion von His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 und His <sub>6</sub> -SUMO-Mgf-3 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS im Bioreaktormaßstab .....	60
Abb. 3-7 Chromatografische Reinigung von His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS .....	62
Abb. 3-8 Enzymatische Abspaltung des His <sub>6</sub> -SUMO- <i>tags</i> der Mfp3-Fusionsproteine.....	63
Abb. 3-9 Enzymatische Abspaltung am Beispiel von His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 und <i>in vitro</i> DOPA-Modifikation von Mefp-3 mit His <sub>6</sub> -mTyr.....	65
Abb. 3-10 Aminosäuresequenz von Mefp-3 mit den potenziellen Hydroxylierungsstellen für die Modifikation durch His <sub>6</sub> -mTyr (Y).....	66
Abb. 3-11 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse von Mefp-3 vor und nach der Reaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase (His <sub>6</sub> -mTyr) zur Bestimmung des DOPA-Gehalts.....	67
Abb. 3-12 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP1A und DP1B <i>E. coli</i> BW3110 im 15 L Bioreaktormaßstab .....	69
Abb. 3-13 Chromatografische Reinigung von DP1B aus <i>E. coli</i> BW3110 .....	71
Abb. 3-14 Untersuchungen zur chromatografischen Reinigung (2. IMAC) von DP1A .....	73

Abb. 3-15 Reinigung der DP1-Proteine aus 1,5 g bis zu 500 g <i>E. coli</i> Biofeuchtmasse (BFM) mittels <i>Inverse transition cycling</i> (ITC).....	76
Abb. 3-16 Ursprüngliche Aminosäuresequenz von DP1A mit den durch Edman-Sequenzierung und ISD/T3-Sequenzierung ermittelten Proteintermini der DP1A-Variante .....	79
Abb. 3-17 Modifikation der DP1-Varianten und qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung .....	81
Abb. 3-18 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse der DP1A-Variante vor und nach der Reaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase (His <sub>6</sub> -mTyr) zur Bestimmung der Anzahl eingefügter OH-Reste.....	82
Abb. 3-19 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP2 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS mit dem Expressionsvektor pET28a_DP2 (KanR) im Bioreaktormaßstab.....	85
Abb. 3-20 Reinigung von DP2 aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS mittels <i>Inverse transition cycling</i> (ITC). 86	
Abb. 3-21 Modifikation von DP2 und qualitativer Nachweis von DOPA mittels NBT-Färbung .....	88
Abb. 3-22 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse DP2 vor und nach der Reaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase (His <sub>6</sub> -mTyr) zur Bestimmung des DOPA-Gehalts.....	89
Abb. 3-23 Messung des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1A-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangs-temperaturen (T <sub>t</sub> ) .....	92
Abb. 3-24 Mfp-3-Sequenzanteile N- und C-terminal des ELP-Blocks in den DP1-Varianten.....	93
Abb. 3-25 Messung des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1B-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangs-temperaturen (T <sub>t</sub> ) .....	94
Abb. 3-26 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Konzentration an DP1A-Variante.....	98
Abb. 3-27 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Applikationszeit der DP1A-Variante während der QCM-Messung .....	100
Abb. 3-28 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Temperatur während der QCM-Messung ..	102
Abb. 3-29 Proteinadsorption der Designer-Proteine an Sensoren mit SiO <sub>2</sub> -Oberfläche.....	104
Abb. 3-30 Dissipationsverhalten der Designer-Proteine an Sensoren mit SiO <sub>2</sub> -Oberfläche.....	106
Abb. 3-31 Einfluss des Lösungsmittels auf die Zug-Scher-Eigenschaften an einer SiO <sub>2</sub> -OF.....	110
Abb. 3-32 Bruchbilder nach den Zug-Scher-Versuchen an SiO <sub>2</sub> -Oberflächen .....	110
Abb. 3-33 Zug-Scher-Eigenschaften der Designer-Proteine an SiO <sub>2</sub> - und Al-OF .....	112
Abb. 8-1 Massenspektrometrische Analyse der 38 kDa Bande nach Reinigung von DP1B mittels <i>Inverse transition cycling</i> (ITC).....	168
Abb. 8-2 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse von His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 vor und nach der Modifikationsreaktion mit der mikrobiellen Tyrosinase.....	171
Abb. 8-3 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse von DP1A .....	171
Abb. 8-4 MALDI-TOF/TOF MS-Analyse der DP1B-Variante .....	172
Abb. 8-5 Aminosäuresequenz von DP1B mit den detektierten Peptiden der ESI-MS/MS-Analyse nach tryptischen Verdau.....	173
Abb. 8-6 Aminosäuresequenz von DP1B mit den detektierten Peptiden der ESI-MS/MS-Analyse nach dem Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin .....	174
Abb. 8-7 SDS-PAGE-Analyse der Expression von pET28a_Mefp3_SD in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS. ....	175
Abb. 8-8 Chromatografische Reinigung von His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3 aus <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS .....	176
Abb. 8-9 Enzymatischer Verdau von His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3 und Modifikation von Mgfp-3 mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase (mTyr) .....	177
Abb. 8-10 SDS-PA-Gele zur heterologen Expression von DP1A und DP1B in <i>E. coli</i> BW3110 in TB-Medium bei 25 °C und Löslichkeitsverteilung nach Zellaufschluss.....	177
Abb. 8-11 Chromatografische Reinigung von DP1A aus <i>E. coli</i> BW3110 .....	178
Abb. 8-12 Chromatografische Reinigung (1. IMAC) von DP1A aus <i>E. coli</i> BW3110.....	178
Abb. 8-13 Reinigung von DP1B aus 1,5 g <i>E. coli</i> BW3110 BFM mittels <i>Inverse transition cycling</i> (ITC) .....	179

Abb. 8-14 Testung des Protease-Inhibitors DFP während der chromatografischen Reinigung von DP1A im kleinen Maßstab und Einfluss von DFP auf die Stabilität von DP1A im Rohextrakt .....	180
Abb. 8-15 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP1A im SK in TB-Medium in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS.....	180
Abb. 8-16 Untersuchungen des Einflusses des Produktionsstammes auf die Stabilität von DP1A im Rohextrakt nach Zellaufschluss .....	181
Abb. 8-17 Ergebnisse zur heterologen Produktion von DP2 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS mit dem Expressionsvektor pET28a_DP2 (Kan <sup>R</sup> +Cm <sup>R</sup> ) bei 25 °C und 37 °C in TB-Medium.....	181
Abb. 8-18 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1A-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangs-temperaturen (T <sub>t</sub> ) .....	182
Abb. 8-19 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs der DP1B-Variante (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangs-temperaturen (T <sub>t</sub> ) .....	183
Abb. 8-20 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs von DP2 (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF zur Ermittlung der Übergangs-temperaturen (T <sub>t</sub> ).....	184
Abb. 8-21 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs von Mefp-3 (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF .....	185
Abb. 8-22 Messungen des thermisch induzierten strukturellen Übergangs von Mgfp-3 (nicht-modifiziert – grün, modifiziert – blau) mittels nanoDSF .....	186
Abb. 8-23 Einfluss der Proteinkonzentration auf die Verteilung der Partikelgröße der DP1A-Variante .....	187
Abb. 8-24 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Proteinkonzentration der DP1A-Variante während der QCM-Messung .....	188
Abb. 8-25 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Applikationszeit der DP1A-Variante während der QCM-Messung .....	189
Abb. 8-26 Abhängigkeit der Frequenzänderung von der Temperatur während der QCM-Messung ..	189
Abb. 8-27 Untersuchungen zum Einfluss von Essigsäure auf die SiO <sub>2</sub> -Sensoroberfläche während der QCM-Messung .....	190
Abb. 8-28 Dissipationsverhalten der Kontrollen BSA und MAPTriX™ an eine SiO <sub>2</sub> -Sensoroberfläche .....	190
Abb. 8-29 Dissipationsverhalten der Muschelfußproteine Mefp-3 und Mgfp-3 an eine SiO <sub>2</sub> -Sensoroberfläche .....	191
Abb. 8-30 Dissipationsverhalten der Designer-Proteine DP1A-Variante und DP2 an eine SiO <sub>2</sub> -Sensoroberfläche .....	192
Abb. 8-31 Bruchbilder nach den Zug-Scher-Versuchen an Al-Oberflächen .....	193
Abb. 8-32 Western-Blot-Analyse der zellfreien Proteinsynthese (CFPS) von DP1A und DP1B .....	193
Abb. 8-33 Schematische Darstellung der Proteinsequenzen für die Zell-freie Proteinsynthese von DP1A im prokaryotischen und eukaryotischen System .....	194
Abb. 8-34 Zellfreie Synthese (CFPS) von DP1A im <i>E. coli</i> System (A) und Sf21 System (B).....	194
Abb. 11-1 Plasmidkarte von pJOE_DP1A.....	204
Abb. 11-2 Plasmidkarte von pET28a_mTyr .....	205
Abb. 11-3 Plasmidkarte pET28a_Mefp3_SD .....	207
Abb. 11-4 Plasmidkarte pET28a_Cer_DP2.....	209
Abb. 11-5 ISD-Fragmentspektrum von Mefp-3 .....	211
Abb. 11-6 ISD/T3-Fragmentspektrum der DP1A-Variante.....	212
Abb. 11-7 ISD/T3-Fragmentspektrum der modifizierten DP1A-Variante zur Lokalisation der Hydroxylierungsstellen .....	215

# 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Übersicht adhäsiver Proteine mariner Organismen .....	11
Tabelle 1-2 Vergleich der bekannten Proteine im Adhäsionsbyssus der Spezies <i>Mytilus</i> hinsichtlich der Lokalisierung im Byssus, Molekulargewicht (MW), Struktur, Modifikation und Funktion. (PPII – Polyprolin-II-Helix; EGF – Epidermaler Wachstumsfaktor; DOPA – L-3,4-Dihydroxyphenylalanin, HyR – Hydroxyarginin; HyP – Hydroxyprolin; pSer – Phosphoserin; Trimer – Masse entspricht dem Trimer; OF – Oberfläche) .....	13
Tabelle 1-3 Übersicht kohäsiver Proteine .....	18
Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	25
Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Stammlösungen .....	27
Tabelle 2-3: Übersicht der verwendeten Puffer und Medien.....	27
Tabelle 2-4: Übersicht der verwendeten molekularbiologischen Enzyme, Reagenzien und Kits .....	28
Tabelle 2-5: Übersicht über die verwendeten Genkonstrukte .....	28
Tabelle 2-6: Übersicht über die verwendeten Marker und Antikörper.....	28
Tabelle 2-7: Übersicht über die verwendeten bakteriellen Stämme.....	29
Tabelle 2-8: Übersicht über die verwendeten Geräte .....	30
Tabelle 2-9 Prüfparameter der <i>in silico</i> Recherche .....	32
Tabelle 2-10 Übersicht der verwendeten Plasmide in <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ , BW3110 oder KRX, sowie deren Antibiotikaresistenz und die finale Konzentration im Medium .....	35
Tabelle 2-11: Übersicht der verwendeten Plasmide in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Gold pLysS .....	35
Tabelle 2-12 Übersicht der verwendeten Plasmide und <i>E. coli</i> Stämme und der jeweils verwendeten finalen Induktionsbedingung .....	37
Tabelle 2-13 Übersicht der verwendeten <i>E. coli</i> Stämme mit dem jeweiligen Expressionsplasmid im Bioreaktormaßstab .....	38
Tabelle 2-14 Übersicht der verwendeten Resuspensionspuffer .....	38
Tabelle 2-15: Zusammensetzung der Trenngele und Sammelgele nach [Laemmli, 1970] .....	39
Tabelle 2-16 Zusammensetzung der verwendeten Puffer zur Reinigung von DP1B mittels His-Gravity columns .....	42
Tabelle 2-17 Finale Resuspensionspuffer zur Lagerung von DP1A/B nach Reinigung mittels ITC .....	43
Tabelle 2-18 Zusammensetzung der Reagenzien für den BCA-Assay .....	44
Tabelle 2-19: Berechnete Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte für die einzelnen Proteine (ExpASy „ProtParam“) .....	44
Tabelle 2-20 Pufferzusammensetzung der mittels nanoDSF untersuchten Proteine .....	45
Tabelle 2-21 Pipettierschema für die enzymatische Reaktion .....	46
Tabelle 2-22 Aufbau der QCM-D Messmethodik zur Proteinadsorption an einer SiO <sub>2</sub> -Oberfläche. Auswahl der Messparameter erfolgte nach [Petrone et al., 2015] und wurden für das qCell T 1.9 System angepasst. ....	49
Tabelle 2-23 Konditionierungsbedingungen der Prüfkörper zur Testung der Zug-Scher-Eigenschaften .....	50
Tabelle 3-1 Übersicht des modularen Aufbaus der Designer-Proteine in der Mfp-3-basierten Fusionsbibliothek .....	51
Tabelle 3-2 Resultate der heterologen Produktion von His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 und His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3 in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS im 30 L Bioreaktor.....	61
Tabelle 3-3 Resultate aller chromatografischen Reinigungen von His <sub>6</sub> -SUMO-Mefp-3 und His <sub>6</sub> -SUMO-Mgfp-3 aus ca. 200 g <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS. Ausbeuten bezogen auf die Proteinmenge pro eingesetztem Gramm Biofeuchtmasse (BFM). ....	62
Tabelle 3-4 Resultate der heterologen Produktion von DP1A und DP1B in <i>E. coli</i> BW3110 im 30 L Bioreaktor .....	70

Tabelle 3-5 Resultate der N-terminalen Sequenzierung nach Edman sowie Bestimmung und Vergleich der Proteinparameter der DP1-Varianten mittels ProtParam.....	78
Tabelle 3-6 Resultate der Aufarbeitungen der DP1-Varianten mittels <i>Inverse transition cycling</i> (ITC) aus ca. 500 – 600 g <i>E. coli</i> BW3110. Ausbeuten beziehen sich auf die Proteinmenge pro eingesetztem Gramm Biofeuchtmasse (BFM). Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt.....	80
Tabelle 3-7 Übersicht der detektierten Massen der DP1A-Varianten aller Ladungszustände mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse (Die theoretische $M_{\text{average}}$ der DP1A-Variante beträgt 34876,64 Da (bestimmt mit dem <i>Peptide Mass Calculator</i> ). Alle Angaben sind in Dalton (Da).....	83
Tabelle 3-8 Resultate der Aufarbeitungen von DP2 mittels <i>Inverse transition cycling</i> (ITC) aus ca. 100 g <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS. Ausbeuten bezogen auf die Proteinmenge pro eingesetztem Gramm Biofeuchtmasse (BFM). Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA-Assay bestimmt.....	87
Tabelle 3-9 Übersicht der detektierten Massen von DP2 aller Ladungszustände mittels MALDI-TOF/TOF MS-Analyse (Die theoretische $M_{\text{average}}$ von DP2 beträgt 67330,84 Da. Alle Angaben sind in Dalton (Da).....	90
Tabelle 3-10 Zusammenfassung der ermittelten Temperaturübergänge ( $T_t$ ) und dem Beginn der Streuung (Aggregationsverhalten) der DP1-Proteine mittels nanoDSF. Gezeigt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen (SD) aus drei Messungen ( $n = 3$ ).....	96
Tabelle 3-11 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen zur Konzentrationsabhängigkeit. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen ( $n = 3$ , SD = Standardabweichung). Zusätzlich sind beispielhaft die $\Delta f$ -Werte aus der 1. Phase (von Schritt 2), der Beladung der Sensoroberfläche mit Protein aus Abb. 3-26 (S. 99) aufgeführt.....	99
Tabelle 3-12 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen zur Abhängigkeit von der Applikationszeit der DP1A-Variante. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen ( $n = 3$ , SD = Standardabweichung).....	100
Tabelle 3-13 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen zur Temperaturabhängigkeit. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen ( $n = 3$ , SD = Standardabweichung).....	102
Tabelle 3-14 Zusammenfassung der finalen Frequenzänderungen aus den QCM-Messungen der Designer-Proteine und deren modifizierten (mod.) Proteinvarianten (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mit Hilfe der mikrobiellen Tyrosinase). Parameter der Proteinapplikation: Konzentration = 0,1 mg/mL im jeweiligen Puffer (Tabelle 2-22, S. 49) mit Ausnahme von BSA = 1 mg/mL, Flussrate = 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ , $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ , $t = 10\text{ min}$ . Gezeigt sind jeweils die Ergebnisse aus drei Messungen ( $n = 3$ , SD = Standardabweichung).....	105
Tabelle 3-15 Zusammenfassung zum Dissipationsverhalten aus den QCM-Messungen der Designer-Proteine und deren mod. Proteinvarianten (Modifikation durch Hydroxylierung der enthaltenen Tyr zu DOPA mittels mikrobieller Tyrosinase). Parameter der Proteinapplikation: Konzentration = 0,1 mg/mL im jeweiligen Puffer (Tabelle 2-22, S. 49) mit Ausnahme von BSA = 1 mg/mL, Flussrate = 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ , $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ , $t = 10\text{ min}$ .....	109
Tabelle 4-1 Übersichtstabelle zur rekombinanten Produktion Mfp- und ELP-basierter Proteine.....	122
Tabelle 4-2 Übersicht zum Einsatz der Pilz-Tyrosinase und der mikrobiellen Tyrosinase zur Hydroxylierung Mfp-basierter Proteine und Peptide.....	130
Tabelle 4-3 Literaturvergleich zur Proteinadsorption Mfp- und ELP-basierter Sequenzen bestimmt mit QCM.....	139
Tabelle 4-4 Literaturvergleich zu den Zug-Scher-Kräften Mfp- und ELP-basierter Sequenzen.....	143
Tabelle 5-1 Übersichtstabelle zur Produktion der Designer-Proteine und der mikrobiellen Tyrosinase ( $\text{His}_6\text{-mTyr}$ ) als Werkzeugenzym, sowie deren Reinigung aus <i>E. coli</i> und Bestimmung der materialwissenschaftlichen Eigenschaften mittels QCM-D und Zwick.....	147
Tabelle 8-1 Zusammensetzung des verwendeten M9-Mediums (NTA – Nitrilotriessigsäure).....	167
Tabelle 8-2 Bedingungen der Flüssigkeitschromatografie (HPLC).....	168
Tabelle 8-3 Proben zur chromatografischen Auftrennung mittels HPLC vor der MALDI-TOF/TOF Analyse.....	169

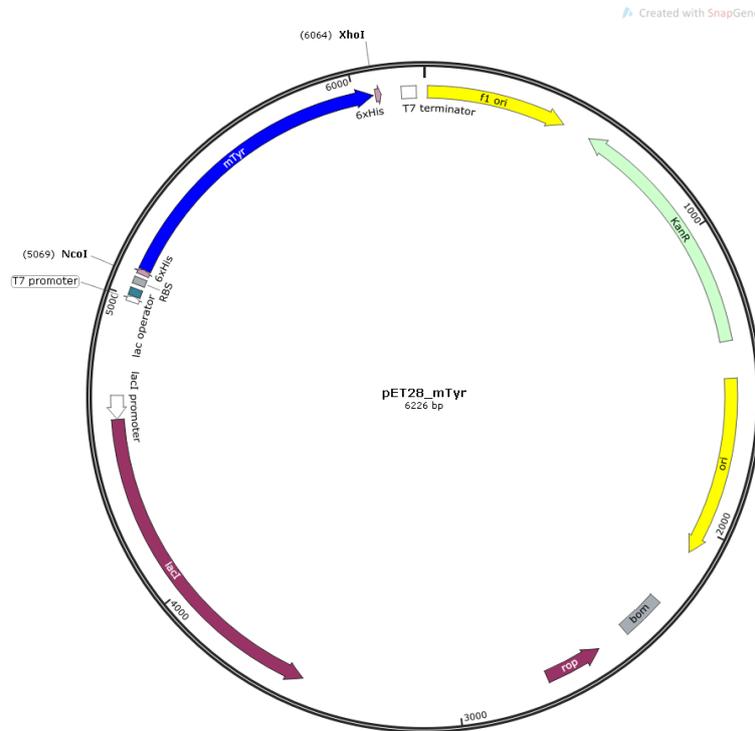
---

Tabelle 8-4 Verwendeter HPLC Gradient.....	169
Tabelle 8-5 Liste der nachgewiesenen DP1B-Peptide nach tryptischen Verdau und anschließender ESI-MS/MS-Analyse.....	173
Tabelle 8-6 Liste der nachgewiesenen DP1B-Peptide nach dem Verdau mit Trypsin und Chymotrypsin und anschließender ESI-MS/MS-Analyse.....	174
Tabelle 8-7 Zusammenfassung der Vorversuche zum ITC zur Ermittlung der besten Bedingung für die Reinigung von DP1B. Die Bewertung (+) erfolgte durch die qualitative Analyse der Bandenintensität von DP1B in der SDS-PAGE und im WB. Puffersystem: 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 300 mM NaCl (pH 8,0).....	179
Tabelle 8-8 Zusammenfassung der gemittelten Startfluoreszenzen der Designer-Proteine mittels nanoDSF (engl. <i>Differential scanning fluorimetry</i> ). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei Messungen (n = 3). Eingesetzt wurden jeweils 0,2 mg/mL jeder Proteinvariante. ....	187
Tabelle 8-9 Zusammenfassung der Ergebnisse der DLS Messungen am ZetaSizer Nano ZS (Malverin Instruments) bei 25 °C durchgeführt von Eike Busmann (AG Prof. Mäder, MLU Halle). Das Protein lag in 10-fach verdünntem ITC-Puffer (1 mM Tris-HCl, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 30 mM NaCl; pH 8.0) vor. Untersucht wurde die Partikelgröße der DP1A-Variante bei folgenden Proteinkonzentrationen: 0,1 mg/mL; 0,2 mg/mL und 0,4 mg/mL. Gezeigt sind die Ergebnisse aus drei Messungen (n = 3). ..	188
Tabelle 8-10 Bestimmung der Trockenmasse Elmers Glue.....	192
Tabelle 8-11 Übersicht zu Protein-Blöcken und deren sequenzen aus der Literatur .....	195
Tabelle 11-1 Ergebnisse der ISD-Analyse von Mefp-3 mit den detektierten N-terminalen (a- und c-Typ) und C-terminalen (y- und z-Typ) Fragment-Ionen, die während der Ionisierung erzeugt wurden. Die Fragment-Ionen wurden zur Bestimmung der terminalen Aminosäuresequenzen von Mefp-3 verwendet. ....	211
Tabelle 11-2 Ergebnisse der ISD-Analyse der DP1A-Variante mit den detektierten N-terminalen (a- und c-Typ) und C-terminalen (y- und z-Typ) Fragment-Ionen, die während der Ionisierung erzeugt wurden. Die Fragment-Ionen wurden zur Bestimmung der terminalen Aminosäuresequenzen der DP1A-Variante verwendet. ....	212
Tabelle 11-3 Ergebnisse der ISD-Analyse der modifizierten DP1A-Variante mit den detektierten N-terminalen (a- und c-Typ) und C-terminalen (y- und z-Typ) Fragment-Ionen, die während der Ionisierung erzeugt wurden. Die Fragment-Ionen wurden zur Bestimmung der terminalen Aminosäuresequenzen sowie der Lokalisation der Hydroxylierungsstellen (Y*) der modifizierten DP1A-Variante verwendet. ....	215



CAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACAACCTGCG  
 GCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCT  
 TGCGCAAACATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCA  
 GGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT  
 CATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAAC  
 GAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACCTTAG  
 ATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACG  
 TGAGTTTTCTGCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAACT  
 GCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTA  
 ACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGC  
 ACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACT  
 CAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACC  
 TACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGT  
 AAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCGCACAGGGGAGCTTCCAGGGGAAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTC  
 GCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTT  
 TTACGGTTCTGCGCCTTTTGTGCTGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGGATAACCGTATATAC  
 CGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAAGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC  
 TGATGCGGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGATG  
 CCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGTTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTG  
 ACGCGCCTGACGGCTTGTCTGCTCCCGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTACAGAGG  
 TTTTACCGTTCATACCGAAACGCGCAGGCGAGCTGCGGTAAGCTCATCAGCGTGGTTCGTGAAGCGATTACAGATGCTGTC  
 CTGTTTATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGGCTTCGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGG  
 TTTTTCTCTGTTTGGTCACTTGTATGCCCTCCGTGTAAGGGGGAATTTCTGTTTTCATGGGGTAATGATACCGATGAAAACGAGAGA  
 GGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATG  
 CGGCGGGACAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAGGTTGAGCCGTTGAGCACC  
 CCGCCGAAGGAATGGTGCATGCTCGATGGCTACGAGGCGAGACAGTAAAGTGGATTTACCATAATCCCTTAATTGTACGACC  
 GCTAAAACGCGTTCAGCGCGATCACGGCAGCAGACAGGTAAAAATGGCAACAAACCCTTAAAACCTGCGCGATCGCGCCTG  
 ATAAATTTAACCGTATGAATACCTATGCAACCAGAGGGTACAGGCCACATTACCCCCACTTAATCCACTGAAGCTGCCATTT  
 TTCATGGTTTACCATCCAGCGAAGGGCCATGCATGCATCGAAATTAATACGACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCAA  
 TTGCGATACCACAATTCAGCAAATGTGAACATCATCACGTTTCATCTTTCCCTGGTTGCCAATGGCCATTTTTCTGTCTGAT  
 AACGAGAAGGTCGC

**Plasmidkarte und Sequenz von „mTyr“: pET28a\_mTyr (kan<sup>R</sup>)**



**Abb. 11-2 Plasmidkarte von pET28a\_mTyr**

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGCCA  
 GCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGG

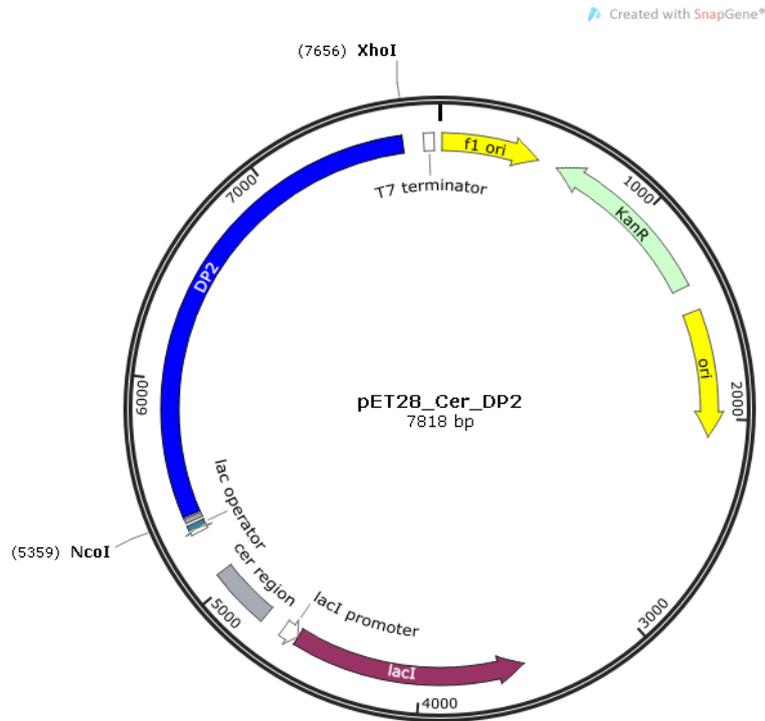
GGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACCCTTGATTAGGGTGATGGTTACGTTAGTGG  
GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAA  
CAACTCAACCTATCTCGGTCTATCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG  
ATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATATAACGTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGG  
AACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCTTTAGAAAACTCATCGAGCATC  
AAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTC  
ACCGAGGAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATT  
TCCCTCGTCAAAAAAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGCCAAAAGTTTATGC  
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCG  
TGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGA  
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCA  
GTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTGTAG  
TCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTTCCCAT  
ACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAA  
TTTTAATCGCGCCCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTTATGTAAGCAGACAG  
TTTTATTGTTTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTGCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT  
TCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTCGCCGA  
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT  
AGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGT  
GGCGATAAGTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTC  
GTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCCACGCTTC  
CCGAAGGGAGAAAGCCGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAC  
GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAG  
CCTATGGA AAAACGCCAGCAACGCGCCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTCGCT  
TATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGC  
GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATA  
TGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTGATG  
GCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT  
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTTCATACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAG  
CGTGGTGTGAAGCGATTACAGATGCTGCCTGTTTATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGG  
CTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTCAT  
GGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTT  
GTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACA  
GATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGCGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCCGCT  
TTCCAGACTTTACGAAACACGGAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGGTGCGCAGACGTTTTGTCAGCAGCAGTCTGCTTC  
ACGTTGCTCGCTATCGGTGATTCATCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCAGCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGC  
ACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCATGCCGGCATAATGGCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGAC  
GAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCT  
CGCCGAAAATGACCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGGCGCGACGATA  
GTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG  
GCCAACGCGCGGGGAGAGGGGTTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATT  
GCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTGGCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGTATGG  
TGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCTGATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCG  
GACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTCAG  
CATTTGCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGA  
GATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGACGCGCCGAGACAGAATTAATGGGCCCCGTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCC  
AATGCGACAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAAATAATACTGTTGATGGGTGCTGGTGCAGAGAC  
ATCAAGAAATAACGCCGAACATTAGTGACAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCA  
GCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGGCTTCGTTCTACCATCGACACCACC  
ACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGC  
AACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCTGCGGAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTT  
CCACTTTTTCCCGGCTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCCGGCATA  
TCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTACATTCACCACCCTGAATTTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCCGG  
AAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGT  
AGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCC  
TGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGCGCGATAT  
AGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTGCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGA



TGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGGCGCAGGA  
ACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTTCTTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCA  
GTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAAATCCGTCAGCCAGTTTAG  
TCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTTAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCAT  
ACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAA  
TTTAATCGCGGGCTAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTTATGTAAGCAGACAG  
TTTTATTGTTTCATGACAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT  
TCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCCTACCAGCGGTGTTTTGTTTGGCGGA  
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT  
AGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGT  
GGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGTTTC  
GTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCCACGCTTC  
CCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAC  
GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAG  
CCTATGGAACAGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTTCTGGCTTTTTGCTGGCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGT  
TATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGC  
GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCTGATGCGGTATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATA  
TGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGTTCATG  
GCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT  
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTTCATCCCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAG  
CGTGGTCTGAAGCGGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGG  
CTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTGGTCACTGATGCCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTTAT  
GGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGGTTACTGGAACGTT  
GTGAGGGTAAACAACGCGGTATGGATGCGGGGGACAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACA  
GATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGCGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGT  
TTCCAGACTTTACGAAACACGAAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGGTGCGCAGCGTTTTGCGCAGCAGCTCGCTTC  
ACGTTGCTCGCTCGGTATCGGTGATTCTTCTGCTAACAGTAAGGCAACCCCGCCAGCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGC  
ACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCATGCCGGCGATAATGGCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGAC  
GAAGCTTGAGCGAGGGCGTGAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCT  
CGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGGCGGACGATA  
GTCATGCCCGCGCCACCAGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG  
GCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATT  
GCCCTTACCAGCTGCGCCTGAGAGATTGCGCAAGCGGTCACCGTGGTTTGGCCAGCAGGGCAAAAATCTGTTTGTATGG  
TGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTTCGGTATCGTCGATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCG  
GACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTGAG  
CATTTGCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCCTCCCGTTCGGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGA  
GATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGCGACGCGCCGAGACAGAATTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCC  
AATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCCTTTCATGGGAGAAAATAAATACTGTTGATGGGTGCTGCTGGTCAGAGAC  
ATCAAGAAAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCA  
GCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACC  
ACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGC  
AACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTT  
CCACTTTTTCCCGGTTTTTCGAGAAACGTTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGGCATAC  
TCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCGCG  
AAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGT  
AGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCGGCCACGGGGCC  
TGCCACCATACCCAGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTGGCGGATAT  
AGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGTGCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGA  
AATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAG  
ATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACGGCAGCGGCTGGTGGCGCGGGCAGCGCTAGCATGTGGACTCAG  
AAGTCAATCAAGAAGCTAAGCCAGAGGTCAAGCCAGAAGTCAAGCCTGAGACTCACATCAATTTAAAGGTGTCCGATGGATCT  
TCAGAGATCTTCTTCAAGATCAAAAAGACCCTCTTTAAGAAGGCTGATGGAAGCGTTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGGAAAT  
GGACTCCTTAAGATTCTTGTACGACGGTATTAGAATCAAGCTGATCAGACCCCTGAAGATTTGGACATGGAGGATAACGATA  
TTATTGAGGCTCACAGAGAACAGATTGGTGGTGTGATTATTATGGTCCAAACTATGGTCTTCAAGACGTTACGGTGGTGGC  
AATATAACAGATACAATAGATATGGCAGACGTTATGGCGGGTATAAAGGCTGGAACAATGGTTGGAATAGAGGCCAGCGGG  
GAAATATTGGTAGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAATGGGTGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGCGCCG

CACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCT  
 GAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAGTATATCCGGAT

**Plasmidkarte und Sequenz von „DP2“: pET28a\_Cer\_DP2 (kan<sup>R</sup>)**



**Abb. 11-4 Plasmidkarte pET28a\_Cer\_DP2**

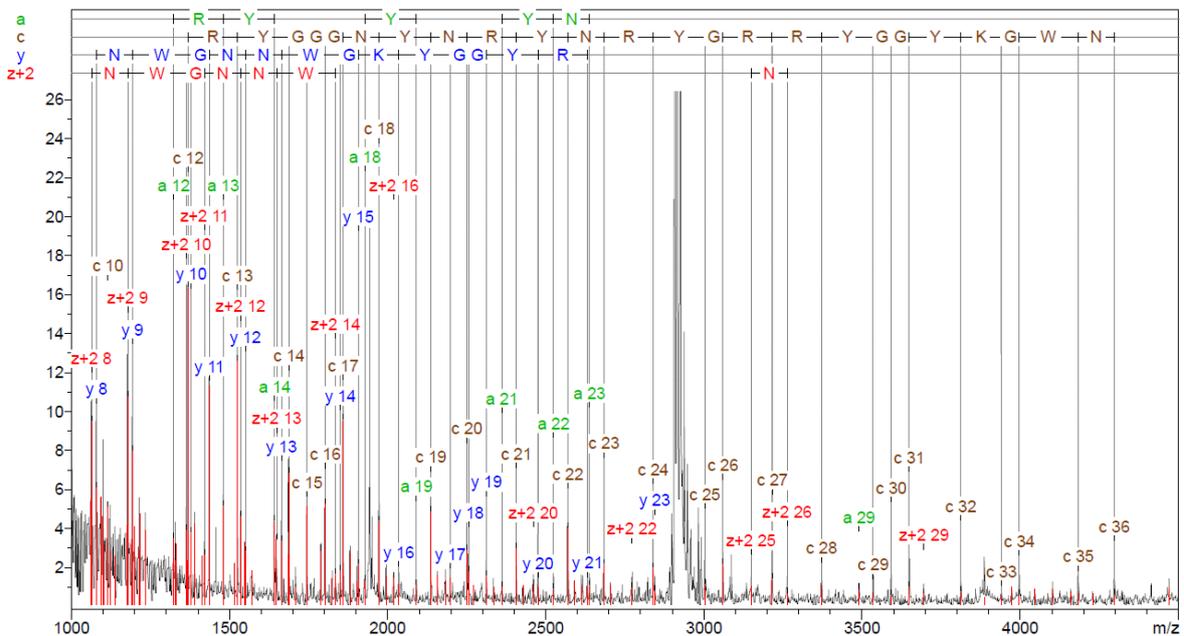
TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTGCCA  
 GCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCTCCGCTCAAGCTCTAAATCGG  
 GGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGG  
 GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGGAGTCCAGGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAAGTGGAA  
 CAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATCTTTGATTTATAAGGGATTTGCGGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTG  
 ATTTAACAAAAATTTAACGGAATTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTACAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGG  
 AACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCTTAGAAAACTCATCGAGCATC  
 AAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGA AAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAAC  
 ACCGAGGCGATTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATT  
 TCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGC  
 ATTTCTTCCAGACTTGTTCACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTTCG  
 TGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGA  
 AACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACTGAATCAGGATATCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCGGGGATCGCA  
 GTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTAG  
 TCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCAT  
 ACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCGACATTATCGCGAGCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAA  
 TTTAATCGCGGCCATAGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAG  
 TTTTATGTTTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT  
 TCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGTACCAGCGGTGGTTGTTTGGCCGGA  
 TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGT  
 AGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGT  
 GCGGATAAGTCTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTTC  
 GTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC  
 CCGAAGGGAGAAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAC  
 GCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAG

CCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGGCTGGCCTTTTGGCTCACATGTTCTTTCTGCGT  
TATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAAACGACCGAGCGCAGC  
GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATA  
TGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCAATG  
GCTGGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGT  
GACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCGTCATCACGAAACGCGGAGGCAGCTGCGGTAAGCTCATCAG  
CGTGGTCGTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAGCGTTAATGTCTGG  
CTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCCTCCGTGTAAGGGGATTTCTGTTTAT  
GGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCAGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCCCGTTACTGGAACGTT  
GTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACA  
GATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGT  
TCCAGACTTTACGAAACACGGAACCGAAGACCATTATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTC  
ACGTTGCTCGCTATCGGTGATTCATTTCTGCTAACAGTAAGGCAACCCCGCCAGCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGC  
ACGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCATGCCGGCGATAATGGCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGAC  
GAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCGCATCATCGTCCGCTCCAGCGAAAGCGGTCTCT  
CGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAGAAGACAGTCATAAGTGGCGGACGATA  
GTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCTAATGAGT  
GAGCTAACTTACATTAATGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCG  
GCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATT  
GCCCTTACCGCCTGGCCCTGAGAGAGTTGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTATGAGT  
TGGTTAACGCGGGGATATAACATGAGCTGTCTTCCGATATCGTATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCCG  
GACTCGGTAATGGCGCGCATTGCGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTCAG  
CATTTGCATGGTTTTGTTGAAAACCGGACATGGCACTCCAGTCCGCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGA  
GATATTTATGCCAGCCAGCCAGACGACGACGCGCCGAGACAGAATTAATGGGCCCCGTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCC  
AATGCGACCAGATGCTCCACGCCAGTCGCGTACCGTCTTATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGAC  
ATCAAGAAAATAACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCA  
GCCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACC  
ACGCTGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGC  
AACGCCAATCAGCAACGACTGTTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTT  
CCACTTTTTTCCCGCTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCTGGTTACCACGCGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCCGGCATA  
CTTGGACATCGTATAACGTTACTGTTTTACATTCACCACCCTGAATGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATACCCGG  
AAAGTTTTTGGCCATTTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGT  
AGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCCGAAATACAGGAACGCACGCTGGATGGCCCTTCGCT  
GGGATGGTGAACCATGAAAATGGCAGCTTTCAGTGGATTAAGTGGGGTAATGTGGCTGTACCCCTCGGTTGCATAGGTAT  
TCATACGGTTAAAATTTATCAGGCGGATCGCGGAGTTTTTCCGGTGGTTTTGTTGCCATTTTACCTGTCTGCTGCCGTGAT  
CGCGTGAACGCGTTTTAGCGGTGCGTACAATTAAGGATTTATGGTAAATCCACTTACTGTCTGCCCTAGCCATCGAGCA  
TGCAAGGAGATGGCGCCAACAGTCCCCGGCCACGGGCTGCCACCATACCCAGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAA  
GTGGCAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTCCGGCATATAGGCGCCAGCAACCCGACCTGTGGCGCCGGTGCATGCCGGCA  
CGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAATCAGACTCACTATAGGGGAATGTGAGCGGATAACA  
ATTTCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGTGGTGTCCGGGTGCGATTCCGGGCGGTGT  
GCCGGTGGTGTTTTTATCCGGTGCGGTCTGGGTGCGCTGGGTGGTGGTGCATGGGTCCGGTGGTAAACCGCTGAAAC  
CGGTTCCGGGTGGTCTGGCGGTGCAGGCTGGGCGCAGGTCTGGGTGCATTTCCGGCGGTTACCTTTCCGGGTGCGCTGGT  
CCGGTGGCGTTGCGGATGCGGCGGACGCGTATAAAGCGGCGAAAGCAGGCGCGGCTGGGCGGCTTCCGGGTGTTGGTGG  
TCTGGGTGTTAGCGCGGTGCGGTTGTTCCGAGCCGGGTGCAGGTGTTAAACCGGTTAAAGTTCCGGGCGTGGTCTGCCGG  
GTGTTTACCAGGTTGGTGTGCTGCCGGGTGCAGTTTTTCCGGGTGTGGGCGTTCTGCCGGGCTTCCGACCGGTGCGGGTGTG  
AAACCGAAAGCGCCGGGTGTTGGCGGCGCATTTGCGGGTATTCCGGGCGTGGGTCCGTTTGGTGGTCCGCAACCGGTTGTTCC  
GCTGGGTTATCCGATTAAGCGCCGAAACTGCCGGTGGTATGGTCTGCCGTATACCCAGGTAACGTCGCTATGGCTATG  
GCCCGGTGGCGTGGCAGGTGCAGCGGTTAAAGCGGTTATCCGACCGGACCGGTGTTGGTCCGACGGCGGACGGCGAGCG  
GCGGCAAAAGCGGACGCAAAATTTGGCGCAGGTGCGGACGGTGTCTGCCGGGCGTGGGCGGTGCGGGCGTCCGGGTGTCCC  
GGGTGCAATCCCGGTATTGGTGGTATTGCGGGTGTGGCACCCCGGACGACGCGGACGCTGCAGCAGCAGCCGCGAAAGCGG  
CAAAATATGGCGCGGACGCGGTTCTGGTTCCGGGCGGTCCGGGTTTTGGTCCGGGTGTGGTGGGTGTTCCGGGCGCAGGTGTG  
CCGGGCGTTGGCGTCCCGGTGCCGGTATTCCGGTGTGCCGGTGCAGGATTCCGGGTGCAGCAGTTCCGGGTGTCTGTTAG  
CCCGAAGCGGCGAGCAAAAGCAGCGGCAAAAGCCGCGAAATACGGCGCACGCCCGGTGTGGGTGTGGGTGGTATTCCGACCT  
ATGGTGTGGTGCAGGTGGTTTTCCGGGCTTTGGTGTGGCGTTGGCGGCATCCCGGGTGTGTCAGGTGTTCCGTCTGTTGGT  
GGCGTTCGGGCGTCCGGCGGCTCCCGGGCGTGGTATTTCTCCGGAAGCGCAGGCGGCTGCTGCAGCCAAAGCAGCTAAATA  
TGGCGTTGGTACCGCGCTGCGGACGAGCGAAAGTGCGGCGAAAGCGGCCAGTTTGGTCTGGTTCCAGGTGTTGGCGTTG  
CGCCAGGTGTGGGTGTTGCACCGGGCGTGGGCGTTGCACCTGGTGTGGCTGGCACCGGGTGTAGGTGTGGCGCCTGGCGTT  
GGTGTGGCCCAGGTGTTGGTGTAGCTCCGGGATTGGCCAGGTGGTGTGTCAGCAGCGGCGAAATCTGCAGCAAAAGTGGC

GGCCAAAGCGCAGCTGCGTGCGGCGGCAGGCCTGGGTGCGGGTATCCCGGGTCTGGGTGTTGGTGTGGTGTGCCGGGCCTGG  
 GTGTGGGTGCAGGCGTTCCGGGTCTGGGCGTGGGCGCTGGTGTCCCGGGCTTCGGTGCAGTGCCGGGTGCCCTGGCAGCAGCA  
 AAAGCGGCGAAATATGGCGCTGCTGTCCGGGCGTGTGGGTGGTCTGGGCGCCCTGGGCGGTGTTGGTATTCCGGGTGGCGT  
 CGTTGGTGCGGGTCCGGCGGCAGCAGCTGCGGCTGCGAAAGCAGCTGCCAAAGCAGCGCAATTTGGCCTGGTTGGTGCGGCTG  
 GTCTGGGCGGTCTGGGTGTGCGGCGGCTGGGCGTCCGGGTGTGGGCGGCTGGGTGGCATTCCGCCGGCAGCCGAGCGAAA  
 GCAGCAAATACGGGCGTGCAGGTCTGGGCGGTGTTCTGGGCGGTGCAGGTCAGTTTCCGCTGGGCGGTGTGGCGGCACGTCC  
 GGGTTCCGGTCTGAGCCCGATTTTTCCGGGTGGTGCCTGTCTGGGTAAAGCGTGTGGCCGTAAACGCAAAGCGGTGGCGGCA  
 GCGCAGATTATTATGTCGAATTATGGCCCTCCGCGTCTGTTATGGTGGTGGCAATTATAACCGCTATAATCGCTATGGTCTGT  
 CGTACGGTGGTTATAAAGTTGGAATAATGGCTGGAATCGTGGTCTGCTGGTAAATATTGGGAGCAGAAGCTGATCTCCGA  
 AGAGGACTTGTAATGATGACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGT  
 TGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAACCGGTCTTGGGGTTTTTTGTGAAAGGA  
 GGAATATATCCGGAT

### MALDI-TOF/TOF MS-Analyse mit ISD (*In-Source Decay*) und T3-Sequenzierung (Analysen durchgeführt von Dr. M. Naumann, Fraunhofer IZI)

Abs. Int. \* 1000



**Abb. 11-5 ISD-Fragmentspektrum von Mefp-3**

Die Darstellung zeigt das durch ISD erzeugte Fragmentspektrum von Mefp-3. Es enthält die detektierten N-terminalen (a-Typ in grün und c-Typ in braun) und C-terminalen (y-Typ in blau und z-Typ in rot) Fragment-Ionen, die während der Ionisierung erzeugt wurden. Die Fragment-Ionen wurden zur Bestimmung der terminalen Aminosäuresequenzen von Mefp-3 verwendet (Tabelle 11-1, S. 211).

**Tabelle 11-1 Ergebnisse der ISD-Analyse von Mefp-3 mit den detektierten N-terminalen (a- und c-Typ) und C-terminalen (y- und z-Typ) Fragment-Ionen, die während der Ionisierung erzeugt**



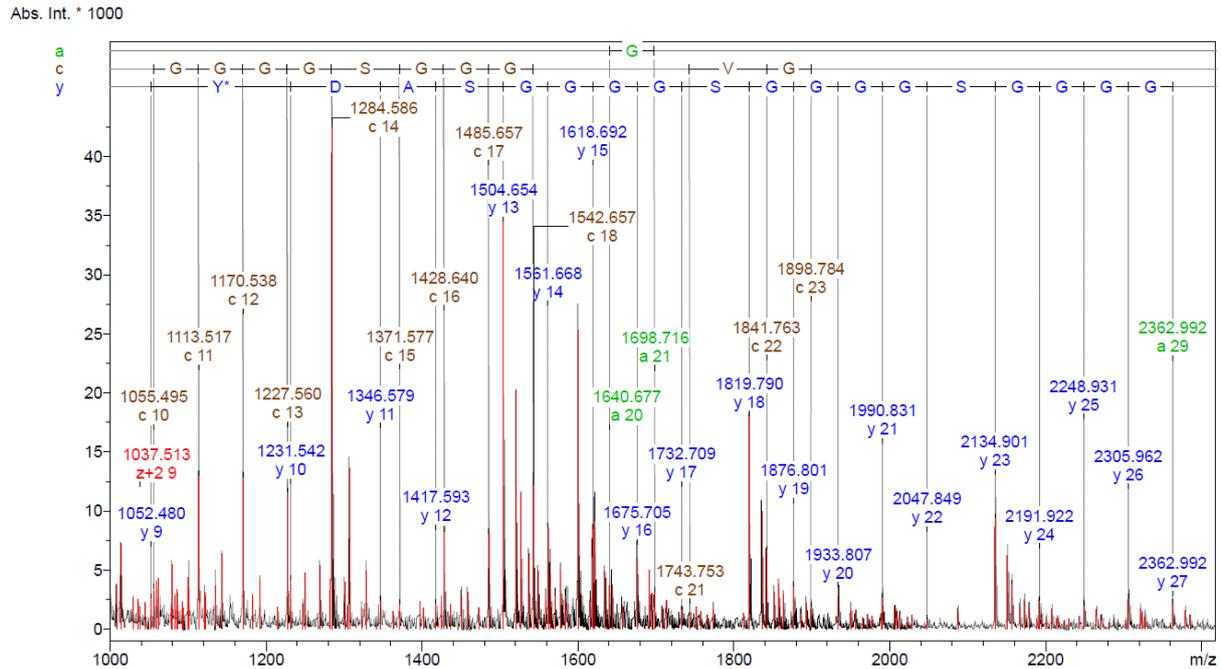
erzeugt wurden. Die Fragment-Ionen wurden zur Bestimmung der terminalen Aminosäuresequenzen der DP1A-Variante verwendet.

N-Term.	Ion	a	c	y	z+2	C-Term.	Ion
1	R	129.113	174.135	175.119	160.108	425	R
2	G	186.135	231.156	272.172	257.161	424	P
3	K	314.230	359.251	369.224	354.214	423	P
4	Y	477.293	522.315	426.246	411.235	422	G
5	W	663.373	708.394	589.309	574.298	421	Y
6	G	720.394	765.415	703.352	688.341	420	N
7	G	777.415	822.437	800.405	785.394	419	P
8	G	834.437	879.458	857.426	842.416	418	G
9	G	891.458	936.480	1020.490	1005.479	417	Y
10	S	978.490	1023.512	1183.553	1168.542	416	Y
11	G	1035.512	1080.533	1298.590	1283.569	415	D
12	G	1092.533	1137.555	1369.617	1354.606	414	A
13	G	1149.555	1194.576	1456.649	1441.638	413	S
14	G	1206.576	1251.598	1513.671	1498.660	412	G
15	S	1293.608	1338.630	1570.692	1555.681	411	G
16	G	1350.630	1395.651	1627.714	1612.703	410	G
17	G	1407.651	1452.673	1684.735	1669.724	409	G
18	G	1464.673	1509.694	1771.767	1756.756	408	S
19	G	1521.694	1566.716	1828.789	1813.778	407	G
20	S	1608.726	1653.748	1885.810	1870.799	406	G
21	G	1665.748	1710.769	1942.831	1927.821	405	G
22	V	1764.816	1809.838	1999.853	1984.842	404	G
23	G	1821.838	1866.859	2086.885	2071.874	403	S
24	V	1920.906	1965.927	2143.906	2128.895	402	G
25	P	2017.959	2062.980	2200.928	2185.917	401	G
26	G	2074.980	2120.002	2257.949	2242.938	400	G
27	V	2174.049	2219.070	2314.971	2299.960	399	G
28	G	2231.070	2276.092	2371.992	2356.981	398	G
29	V	2330.138	2375.160	2471.061	2456.050	397	V
30	P	2427.191	2472.213	2528.082	2513.071	396	G
31	G	2484.213	2529.234	2625.135	2610.124	395	P
32	V	2583.281	2628.303	2724.203	2709.192	394	V
33	G	2640.303	2685.324	2781.225	2766.214	393	G
34	V	2739.371	2784.392	2838.247	2823.236	392	V
35	P	2836.424	2881.445	2937.315	2922.304	391	G
36	G	2893.445	2938.467	3036.387	3021.376	390	P
37	V	2992.514	3037.535	3133.436	3118.425	389	V
38	G	3049.535	3094.557	3190.457	3175.446	388	G
39	V	3148.604	3193.625	3289.526	3274.515	387	V
40	P	3245.656	3290.678	3346.547	3331.536	386	G
41	G	3302.678	3347.699	3443.600	3428.589	385	P
42	V	3401.746	3446.768	3542.668	3527.657	384	V
43	G	3458.768	3503.789	3599.690	3584.679	383	G
44	V	3557.836	3602.857	3698.758	3683.747	382	V
45	P	3654.889	3699.910	3755.780	3740.769	381	G
46	G	3711.910	3756.932	3852.832	3837.822	380	P
47	V	3810.979	3856.000	3951.901	3936.890	379	V
48	G	3868.000	3913.022	4008.922	3993.911	378	G
49	V	3967.069	4012.090	4107.991	4092.980	377	V
50	P	4064.121	4109.143	4165.012	4150.001	376	G
51	G	4121.143	4166.164	4262.065	4247.054	375	P
52	V	4220.211	4265.233	4361.133	4346.122	374	V
53	G	4277.233	4322.254	4418.155	4403.144	373	G
54	V	4376.301	4421.323	4517.223	4502.212	372	V
55	P	4473.354	4518.375	4574.245	4559.234	371	G
56	G	4530.375	4575.397	4671.297	4656.287	370	P
57	V	4629.444	4674.465	4770.366	4755.355	369	V
58	G	4686.465	4731.487	4827.387	4812.376	368	G
59	V	4785.534	4830.555	4926.456	4911.445	367	V
60	P	4882.586	4927.608	4983.477	4968.466	366	G
61	G	4939.608	4984.629	5080.530	5065.519	365	P
62	V	5038.676	5083.698	5179.598	5164.588	364	V
63	G	5095.698	5140.719	5236.620	5221.609	363	G
64	V	5194.766	5239.788	5335.688	5320.677	362	V
65	P	5291.819	5336.840	5392.710	5377.699	361	G
66	G	5348.840	5393.862	5489.763	5474.752	360	P
67	V	5447.909	5492.930	5586.811	5571.800	359	V
68	G	5503.930	5548.952	5643.832	5628.821	358	G
69	V	5603.999	5649.020	5744.921	5729.910	357	V
70	P	5701.051	5746.073	5801.942	5786.931	356	G
71	G	5758.073	5803.094	5898.995	5883.984	355	P
72	V	5857.141	5902.163	5998.063	5983.053	354	V
73	G	5914.163	5959.184	6055.085	6040.074	353	G
74	V	6013.231	6058.253	6154.153	6139.142	352	V
75	P	6110.284	6155.305	6211.175	6196.164	351	G
76	G	6167.305	6212.327	6308.228	6293.217	350	P
77	V	6266.374	6311.395	6407.296	6392.285	349	V
78	G	6323.395	6368.417	6464.317	6449.306	348	G
79	V	6422.464	6467.485	6563.386	6548.375	347	V
80	P	6519.516	6564.538	6620.407	6605.396	346	G
81	G	6576.538	6621.559	6717.460	6702.449	345	P
82	V	6675.606	6720.628	6816.528	6801.518	344	V
83	G	6732.628	6777.649	6873.550	6858.539	343	G
84	V	6831.696	6876.718	6972.618	6957.607	342	V
85	P	6928.749	6973.770	7029.640	7014.629	341	G
86	G	6985.770	7030.792	7126.693	7111.682	340	P
87	V	7084.839	7129.860	7225.761	7210.750	339	V
88	G	7141.860	7196.882	7282.782	7267.772	338	G
89	V	7240.929	7285.950	7381.851	7366.840	337	V
90	P	7337.981	7383.003	7438.872	7423.861	336	G
91	G	7395.003	7440.024	7535.925	7520.914	335	P
92	V	7494.071	7539.093	7634.994	7619.983	334	V
93	G	7551.093	7596.114	7692.015	7677.004	333	G
94	V	7650.161	7695.183	7791.083	7776.073	332	V
95	P	7747.214	7792.235	7848.105	7833.094	331	G
96	G	7804.235	7849.257	7945.158	7930.147	330	P
97	V	7903.304	7948.325	8044.226	8029.215	329	V
98	G	7960.325	8005.347	8101.248	8086.237	328	G
99	V	8059.394	8104.415	8200.316	8185.305	327	V
100	P	8156.446	8201.468	8257.337	8242.326	326	G
101	G	8213.468	8258.489	8354.390	8339.379	325	P
102	V	8312.536	8357.558	8453.459	8438.448	324	V
103	G	8369.558	8414.579	8510.480	8495.469	323	G
104	V	8468.626	8513.648	8609.548	8594.538	322	V
105	P	8565.679	8610.700	8666.570	8651.559	321	G
106	G	8622.700	8667.722	8763.623	8748.612	320	P
107	V	8721.769	8766.790	8862.691	8847.680	319	V
108	G	8778.790	8823.812	8919.713	8904.702	318	G
109	V	8877.859	8922.880	9018.781	9003.770	317	V
110	P	8974.912	9019.933	9075.802	9060.792	316	G
111	G	9031.933	9076.954	9172.855	9157.844	315	P
112	V	9131.001	9176.023	9271.924	9256.913	314	V

N-Term.	Ion	a	c	y	z+2	C-Term.	Ion
113	G	9188.023	9233.044	9328.945	9313.934	313	G
114	V	9287.091	9332.113	9428.013	9413.003	312	V
115	P	9384.144	9429.166	9485.035	9470.024	311	G
116	G	9441.166	9486.187	9582.088	9567.077	310	P
117	V	9540.234	9585.255	9681.156	9666.145	309	V
118	G	9597.255	9642.277	9738.178	9723.167	308	G
119	V	9696.324	9741.345	9837.246	9822.235	307	V
120	P	9793.377	9838.398	9894.267	9879.257	306	G
121	G	9850.398	9895.419	9991.320	9976.309	305	P
122	V	9949.466	9994.488	10090.389	10075.378	304	V
123	G	10006.488	10051.509	10147.410	10132.399	303	G
124	V	10105.556	10150.578	10246.479	10231.468	302	V
125	P	10202.609	10247.631	10303.500	10288.489	301	G
126	G	10259.631	10304.652	10400.553	10385.542	300	P
127	V	10358.699	10403.720	10499.621	10484.610	299	V
128	G	10415.720	10460.742	10556.643	10541.632	298	G
129	V	10514.789	10559.810	10655.711	10640.700	297	V
130	P	10611.842	10656.863	10712.733	10697.722	296	G
131	G	10668.863	10713.885	10809.785	10794.774	295	P
132	V	10767.931	10812.953	10908.854	10893.843	294	V
133	G	10824.953	10869.974	10965.875	10950.864	293	G
134	V	10924.021	10969.043	11064.944	11049.933	292	V
135	P	11021.074	11066.096	11121.965	11106.954	291	G
136	G	11078.096	11123.117	11219.018	11204.007	290	P
137	V	11177.164	11222.185	11318.086	11303.075	289	V
138	G	11234.185	11279.207	11375.108	11360.097	288	G
139	V	11333.254	11378.275	11474.176	11459.165	287	V
140	P	11430.307	11475.328	11531.198	11516.187	286	G
141	G	11487.328	11532.350	11588.220	11573.209	285	P
142	V	11586.397	11631.418	11727.319	11712.308	284	V
143	G	11643.418	11688.439	11784.340	11769.329	283	G
144	V	11742.486	11787.508	11883.409	11868.398	282	V
145	P	11839.539	11884.561	11940.430	11925.419	281	G
146	G	11896.561	11941.582	12037			

N-Term.	lon	a	c	y	z+2	C-Term.	lon
78	G	6323.395	6368.417	6464.317	6449.307	348	G
79	V	6422.464	6467.485	<b>6563.386</b>	6548.375	347	V
80	P	6519.516	6564.538	6620.407	6605.396	346	G
81	G	6576.538	6621.559	6717.460	6702.449	345	P
82	V	6675.606	6720.628	6816.528	6801.518	344	V
83	G	6732.628	6777.649	6873.550	6858.539	343	G
84	V	6831.696	6876.718	<b>6972.618</b>	6957.607	342	V
85	P	6928.749	6973.770	7029.640	7014.629	341	G
86	G	6985.770	<b>7030.792</b>	7126.693	7111.682	340	P
87	V	7084.839	7129.860	7225.761	7210.750	339	V
88	G	7141.860	7186.882	7282.782	7267.772	338	G
89	V	7240.929	7285.950	<b>7381.851</b>	7366.840	337	V
90	P	7337.981	7383.003	7438.872	7423.861	336	G
91	G	7395.003	<b>7440.024</b>	7535.925	7520.914	335	P
92	V	7494.071	7539.093	7634.994	7619.983	334	V
93	G	7551.093	7596.114	7692.015	7677.004	333	G
94	V	7650.161	7695.183	7791.083	7776.073	332	V
95	P	7747.214	7792.235	7848.105	7833.094	331	G
96	G	7804.235	7849.257	7945.158	7930.147	330	P
97	V	7903.304	7948.325	8044.226	8029.215	329	V
98	G	7960.325	8005.347	8101.248	8086.237	328	G
245	P	20024.190	20069.211	20125.080	20110.070	181	G
246	G	20081.211	20126.232	20222.133	20207.122	180	P
247	V	20180.279	20225.301	20321.202	20306.191	179	V
248	G	20237.301	20282.322	20378.223	20363.212	178	G
249	V	20336.369	20381.391	20477.292	20462.281	177	V
250	P	20433.422	20478.444	20534.313	20519.302	176	G
251	G	20490.444	20535.465	20631.366	20616.355	175	P
252	V	20589.512	20634.533	20730.434	20715.423	174	V
253	G	20646.533	20691.555	20787.456	20772.445	173	G
254	V	20745.602	20790.623	20886.524	20871.513	172	V
255	P	20842.655	20887.676	20943.545	20928.535	171	G
256	G	20899.676	20944.698	21040.598	21025.587	170	P
257	V	20998.744	21043.766	21139.667	21124.656	169	V
258	G	21055.766	21100.787	21196.688	21181.677	168	G
259	V	21154.834	21199.856	21295.757	21280.746	167	V
260	P	21251.887	21296.909	21352.778	21337.767	166	G
261	G	21308.909	21353.930	21449.831	21434.820	165	P
262	V	21407.977	21452.998	21548.899	21533.888	164	V
263	G	21464.998	21510.020	21605.921	21590.910	163	G
264	V	21564.067	21609.088	21704.989	21689.978	162	V
265	P	21661.120	21706.141	21762.011	21747.000	161	G
266	G	21718.141	21763.163	21859.063	21844.052	160	P
267	V	21817.210	21862.231	21958.132	21943.121	159	V
268	G	21874.231	21919.252	22015.153	22000.142	158	G
269	V	21973.299	22018.321	22114.222	22099.211	157	V
270	P	22070.352	22115.374	22171.243	22156.232	156	G
271	G	22127.374	22172.395	22268.296	22253.285	155	P
272	V	22226.442	22271.463	22367.364	22352.353	154	V
273	G	22283.463	22328.485	22424.386	22409.375	153	G
274	V	22382.532	22427.553	22523.454	22508.443	152	V
275	P	22479.585	22524.606	22580.476	22565.465	151	G
276	G	22536.606	22581.628	22677.528	22662.517	150	P
277	V	22635.675	22680.696	22776.597	22761.586	149	V
278	G	22692.696	22737.717	22833.618	22818.607	148	G
279	V	22791.764	22836.786	22932.687	22917.676	147	V
280	P	22888.817	22933.839	22989.708	22974.697	146	G
281	G	22945.839	22990.860	23086.761	23071.750	145	P
282	V	23044.907	23089.929	23185.829	23170.818	144	V
283	G	23101.929	23146.950	23242.851	23227.840	143	G
284	V	23200.997	23246.018	23341.919	23326.908	142	V
285	P	23298.050	23343.071	23398.941	23383.930	141	G
286	G	23355.071	23400.093	23495.993	23480.982	140	P
287	V	23454.140	23499.161	23595.062	23580.051	139	V
288	G	23511.161	23556.183	23652.083	23637.072	138	G
289	V	23610.229	23655.251	23751.152	23736.141	137	V
290	P	23707.282	23752.304	23808.173	23793.162	136	G
291	G	23764.304	23809.325	23905.226	23890.215	135	P
292	V	23863.372	23908.394	24004.294	23989.283	134	V
293	G	23920.394	23965.415	24061.316	24046.305	133	G
294	V	24019.462	24064.483	24160.384	24145.373	132	V
295	P	24116.515	24161.536	24217.406	24202.395	131	G
296	G	24173.536	24218.558	24314.458	24299.448	130	P
297	V	24272.605	24317.626	24413.527	24398.516	129	V
298	G	24329.626	24374.648	24470.548	24455.537	128	G
299	V	24428.694	24473.716	24569.617	24554.606	127	V
300	P	24525.747	24570.769	24626.638	24611.627	126	G
301	G	24582.769	24627.790	24723.691	24708.680	125	P
302	V	24681.837	24726.859	24822.759	24807.748	124	V
303	G	24738.859	24783.880	24879.781	24864.770	123	G
304	V	24837.927	24882.948	24978.849	24963.838	122	V
305	P	24934.980	24980.011	25075.871	25020.860	121	G
306	G	24992.001	25037.023	25172.923	25117.913	120	P
307	V	25091.070	25136.091	25271.992	25216.981	119	V
308	G	25148.091	25193.113	25289.013	25274.002	118	G
309	V	25247.160	25292.181	25388.082	25373.071	117	V
310	P	25344.212	25389.234	25445.103	25430.092	116	G
311	G	25401.234	25446.255	25542.156	25527.145	115	P
312	V	25500.302	25545.324	25641.224	25626.213	114	V
313	G	25557.324	25602.345	25698.246	25683.235	113	G
314	V	25656.392	25701.414	25797.314	25782.303	112	V
315	P	25753.445	25798.466	25854.336	25839.325	111	G
316	G	25810.466	25855.488	25951.388	25936.377	110	P
317	V	25909.535	25954.556	26050.457	26035.446	109	V
318	G	25966.556	26011.578	26107.478	26092.467	108	G
319	V	26065.625	26110.646	26206.547	26191.536	107	V
320	P	26162.677	26207.699	26263.568	26248.557	106	G
321	G	26219.699	26264.720	26360.621	26345.610	105	P
322	V	26318.767	26363.789	26459.689	26444.679	104	V
323	G	26375.789	26420.810	26516.711	26501.700	103	G
324	V	26474.857	26519.879	26615.779	26600.768	102	V
325	P	26571.910	26616.931	26672.801	26657.790	101	G
326	G	26628.931	26673.953	26769.854	26754.843	100	P
327	V	26728.000	26773.021	26868.922	26853.911	99	V
328	G	26785.021	26830.043	26925.943	26910.933	98	G
329	V	26884.090	26929.111	27025.012	27010.001	97	V
330	P	26981.142	27026.164	27082.033	27067.022	96	G
331	G	27038.164	27083.185	27179.086	27164.075	95	P
332	V	27137.232	27182.254	27276.154	27261.144	94	V
333	G	27194.254	27239.275	27373.176	27358.165	93	G
334	V	27293.322	27338.344	27434.244	27419.233	92	V
335	P	27390.375	27435.396	27491.266	27476.255	91	G
336	G	27447.396	27492.418	27588.319	27573.308	90	P
337	V	27546.465	27591.486	27687.387	27672.376	89	V
338	G	27603.486	27648.508	27744.408	27729.398	88	G
339	V	27702.555	27747.576	27843.477	27828.466	87	V
340	P	27799.607	27844.629	27900.498	27885.487	86	G
341	G	27856.629	27901.650	27997.551	27982.540	85	P
342	V	27955.697	28000.719	28096.619	28081.609	84	V
343	G	28012.719	28057.740	28153.641	28138.630	83	G
344	V	28111.787	28156.809	28252.709	28237.698	82	V

N-Term.	lon	a	c	y	z+2	C-Term.	lon
345	P	28208.840	28253.861	28309.731	28294.720	81	G
346	G	28265.861	28310.883	28406.784	28391.773	80	P
347	V	28364.930	28409.951	28505.852	28490.841	79	V
348	G	28421.951	28466.973	28562.873	28547.863	78	G
349	V	28521.020	28566.041	28661.942	28646.931	77	V
350	P	28618.072	28663.094	28718.963	28703.952	76	G
351	G	28675.094	28720.115	28816.016	28801.005	75	P
352	V	28774.162	28819.184	28915.085	28900.074	74	V
353	G	28831.184	28876.205	28972.085	28957.075	73	G
354	V	28930.252	28975.274	29071.174	29056.164	72	V
355	P	29027.305	29072.326	29128.196	29113.185	71	G
356	G	29084.326	29129.348	29225.249	29210.238	70	P
357	V	29183.395	29228.416	29324.317	29309.306	69	V
358	G	29240.416	29285.438	29381.339	29366.328	68	G
359	V	29339.485	29384.506	29480.407	29465.396	67	V
360	P	29436.537	29481.559	29537.428	29522.417	66	G
361	G	29493.559	29538.580	29634.481	29619.470	65	P
362	V	29592.627	29637.649	29733.550	29718.539	64	V
363	G	29649.649	29694.670	29790.571	29775.560	63	G
364	V	29748.717	29793.739	29889.			



**Abb. 11-7** ISD/T3-Fragmentspektrum der modifizierten DP1A-Variante zur Lokalisation der Hydroxylierungsstellen

Die Darstellung zeigt das durch ISD erzeugte Fragmentspektrum der modifizierten DP1A-Variante. Es enthält die detektierten N-terminalen (a-Typ in grün und c-Typ in braun) und C-terminalen (y-Typ in blau und z-Typ in rot) Fragment-Ionen, die während der Ionisierung erzeugt wurden. Die Fragment-Ionen wurden zur Bestimmung der terminalen Aminosäuresequenzen sowie der Lokalisation der Hydroxylierungsstellen (DOPA) der modifizierten DP1A-Variante verwendet (Abb. 3-16, S. 79).

**Tabelle 11-3** Ergebnisse der ISD-Analyse der modifizierten DP1A-Variante mit den detektierten N-terminalen (a- und c-Typ) und C-terminalen (y- und z-Typ) Fragment-Ionen, die während der Ionisierung erzeugt wurden. Die Fragment-Ionen wurden zur Bestimmung der terminalen

**Aminosäuresequenzen sowie der Lokalisation der Hydroxylierungsstellen (Y\*) der modifizierten DP1A-Variante verwendet.**

N-Term.	Ion	a	c	y	z+z2	C-Term.	Ion
1	R	129.113	174.135	175.119	160.108	425	R
2	G	186.135	231.156	272.172	257.161	424	P
3	K	314.230	359.251	369.224	354.214	423	P
4	Y*	509.283	554.305	426.246	411.235	422	G
5	W	695.362	740.384	605.304	590.293	421	Y*
6	G	752.384	797.405	719.347	704.336	420	N
7	G	809.405	854.427	816.400	801.389	419	P
8	G	866.427	911.448	873.421	858.410	418	G
9	G	923.448	968.470	1052.480	1037.469	417	Y*
10	S	1010.480	1055.502	1231.538	1216.527	416	Y*
11	G	1067.502	1112.523	1346.565	1331.554	415	D
12	G	1124.523	1169.545	1417.602	1402.591	414	A
13	G	1181.545	1226.566	1504.634	1489.623	413	S
14	G	1238.566	1283.588	1561.655	1546.644	412	G
15	S	1325.598	1370.620	1618.677	1603.666	411	G
16	G	1382.620	1427.641	1675.698	1660.687	410	G
17	G	1439.641	1484.663	1732.720	1717.709	409	G
18	G	1496.663	1541.684	1789.742	1774.731	408	S
19	G	1553.684	1598.705	1846.763	1831.752	407	G
20	S	1640.716	1685.737	1933.795	1918.784	406	G
21	G	1697.737	1742.759	1990.816	1975.805	405	G
22	V	1796.806	1841.827	2047.838	2032.827	404	G
23	G	1853.827	1898.849	2134.870	2119.859	403	S
24	V	1952.896	1997.917	2191.891	2176.880	402	G
25	P	2049.949	2094.970	2248.913	2233.902	401	G
26	G	2106.970	2151.991	2305.934	2290.923	400	G
27	V	2206.038	2251.059	2362.956	2347.945	399	G
28	G	2263.060	2308.081	2419.977	2404.966	398	G
29	V	2362.128	2407.150	2519.045	2504.035	397	V
30	P	2459.181	2504.203	2576.067	2561.056	396	G
31	G	2516.203	2561.224	2673.120	2658.109	395	P
32	V	2615.271	2660.292	2712.188	2707.177	394	V
33	G	2672.292	2717.314	2829.210	2814.199	393	G
34	V	2771.361	2816.382	2928.278	2913.267	392	V
35	P	2868.414	2913.435	2985.299	2970.288	391	G
36	G	2925.435	2970.457	3082.352	3067.341	390	P
37	V	3024.503	3069.525	3181.421	3166.410	389	V
38	G	3081.525	3126.546	3238.442	3223.431	388	G
39	V	3180.593	3225.615	3337.510	3322.500	387	V
40	P	3277.646	3322.668	3394.532	3379.521	386	G
41	G	3334.668	3379.689	3491.585	3476.574	385	P
42	V	3433.736	3478.757	3590.653	3575.642	384	V
43	G	3490.757	3535.779	3647.675	3632.664	383	G
44	V	3589.826	3634.847	3746.743	3731.732	382	V
45	P	3686.879	3731.900	3803.764	3788.754	381	G
46	G	3743.900	3788.922	3900.817	3885.806	380	P
47	V	3842.968	3887.990	3999.886	3984.875	379	V
48	G	3899.990	3945.011	4056.907	4041.896	378	G
49	V	3999.058	4044.080	4155.975	4140.965	377	V
50	P	4096.111	4141.133	4212.997	4197.986	376	G
51	G	4153.133	4198.154	4310.050	4295.039	375	P
52	V	4252.201	4297.222	4409.118	4394.107	374	V
53	G	4309.222	4354.244	4466.140	4451.129	373	G
54	V	4408.291	4453.312	4565.208	4550.197	372	V
55	P	4505.344	4550.365	4622.229	4607.219	371	G
56	G	4562.365	4607.387	4719.282	4704.271	370	P
57	V	4661.434	4706.455	4818.351	4803.340	369	V
58	G	4718.455	4763.476	4875.372	4860.361	368	G
59	V	4817.523	4862.544	4974.441	4959.430	367	V
60	P	4914.576	4959.598	5031.462	5016.451	366	G
61	G	4971.598	5016.619	5128.515	5113.504	365	P
62	V	5070.666	5115.688	5227.583	5212.572	364	V
63	G	5127.688	5172.709	5284.605	5269.594	363	G
64	V	5226.756	5271.777	5383.673	5368.662	362	V
65	P	5323.809	5368.830	5440.695	5425.684	361	G
66	G	5380.830	5425.852	5537.747	5522.736	360	P
67	V	5479.899	5524.920	5636.816	5621.805	359	V
68	G	5536.920	5581.941	5693.837	5678.826	358	G
69	V	5635.988	5681.010	5792.906	5777.895	357	V
70	P	5733.041	5778.063	5891.972	5876.961	356	G
71	G	5790.063	5835.084	5946.985	5931.974	355	P
72	V	5889.131	5934.153	6046.048	6031.037	354	V
73	G	5946.153	5991.174	6103.070	6088.059	353	G
74	V	6045.221	6090.242	6202.138	6187.127	352	V
75	P	6142.274	6187.295	6299.203	6284.192	351	G
76	G	6199.295	6244.317	6396.268	6381.257	350	P
77	V	6298.364	6343.385	6493.332	6478.321	349	V
78	G	6355.385	6400.407	6590.397	6575.386	348	G
79	V	6454.453	6499.474	6687.462	6672.451	347	V
80	P	6553.522	6602.543	6784.527	6769.516	346	G
81	G	6608.543	6653.564	6881.592	6866.581	345	P
82	V	6707.611	6752.632	6978.657	6963.646	344	V
83	G	6764.632	6809.653	7075.722	7060.711	343	G
84	V	6863.699	6908.720	7172.787	7157.776	342	V
85	P	6962.767	7007.788	7269.852	7254.841	341	G
86	G	7017.788	7062.809	7366.917	7351.906	340	P
87	V	7116.856	7161.877	7463.982	7448.971	339	V
88	G	7173.877	7218.898	7561.047	7546.036	338	G
89	V	7272.945	7317.966	7658.112	7643.101	337	V
90	P	7369.971	7414.987	7755.177	7740.166	336	G
91	G	7426.992	7472.008	7852.242	7837.231	335	P
92	V	7526.061	7571.082	7949.307	7934.296	334	V
93	G	7583.082	7628.103	8046.372	8031.361	333	G
94	V	7682.151	7727.172	8143.437	8128.426	332	V
95	P	7779.220	7824.241	8240.502	8225.491	331	G
96	G	7836.241	7881.262	8337.567	8322.556	330	P
97	V	7935.310	7980.331	8434.632	8419.621	329	V
98	G	7992.331	8037.352	8531.697	8516.686	328	G
99	V	8091.400	8136.421	8628.762	8613.751	327	V
100	P	8188.469	8233.490	8725.827	8710.816	326	G
101	G	8245.489	8290.510	8822.892	8807.881	325	P
102	V	8344.558	8389.579	8919.957	8904.946	324	V

N-Term.	Ion	a	c	y	z+z2	C-Term.	Ion
103	G	8401.548	8446.569	8558.485	8543.474	323	V
104	V	8500.616	8545.638	8657.533	8642.522	322	V
105	P	8597.689	8642.690	8714.555	8699.544	321	G
106	G	8654.690	8699.712	8811.607	8796.597	320	P
107	V	8753.759	8798.780	8910.676	8895.665	319	V
108	G	8810.780	8855.802	8967.697	8952.686	318	G
109	V	8909.849	8954.870	9066.766	9051.755	317	V
110	P	9006.901	9051.923	9123.787	9108.776	316	G
111	G	9063.923	9108.944	9220.840	9205.829	315	P
112	V	9162.991	9208.013	9319.908	9304.897	314	V
113	G	9220.013	9265.034	9376.930	9361.919	313	G
114	V	9319.081	9364.103	9475.998	9460.987	312	V
115	P	9416.134	9461.155	9533.020	9518.009	311	G
116	G	9473.155	9518.177	9630.072	9615.062	310	P
117	V	9572.224	9617.245	9729.141	9714.130	309	V
118	G	9629.245	9674.267	9786.162	9771.151	308	G
119	V	9728.314	9773.335	9885.231	9870.220	307	V
120	P	9825.366	9870.388	9942.252	9927.241	306	G
121	G	9882.388	9927.409	10039.305	10024.294	305	P
122	V	9981.456	10026.478	10138.373	10123.362	304	V
123	G	10038.478	10083.499	10195.395	10180.384	303	G
124	V	10137.546	10182.568	10294.463	10279.452	302	V
125	P	10234.599	10279.620	10351.485	10336.474	301	G
126	G	10291.620	10336.642	10448.538	10433.527	300	P
127	V	10390.689	10435.710	10547.606	10532.595	299	V
128	G	10447.710	10492.732	10646.674	10631.663	298	G
129	V	10546.779	10591.800	10745.742	10730.731	297	V
130	P	10645.831	10690.853	10844.810	10829.799	296	G
131	G	10700.853	10745.874	10943.878	10928.867	295	P
132	V	10799.921	10844.943	11042.946	11027.935	294	V
133	G	10854.943	10900.964	11142.014	11127.003	293	G
134	V	10954.011	11001.033	11241.082	11226.071	292	V
135	P	11053.064	11098.085	11340.150	11325.139	291	G
136	G	11110.085	11155.107	11439.218	11424.207	290	P
137	V	11209.154	11254.175	11538.286	11523.275	289	V
138	G	11266.175	11311.197	11637.354	11622.343	288	G
139	V	11365.244	11410.266	11736.422	11721.411	287	V
140	P	11464.296	11507.318	11835.490	11820.479	286	G
141	G	11519.318	11564.339	11934.558	11919.547	285	P
142	V	11618.386	11663.407	12033.626	12018.615	284	V
143	G	11673.407	11720.429	12132.694	12117.683	283	G
144	V	11772.476	11819.498	12231.762	12216.751	282	V
145	P	11871.529	11918.567	12330.830	12315.819	281	G
146	G	11920.550	11973.572</				

N-Term.	lon	a	c	y	z+2	C-Term.	lon
205	P	16782.319	16827.341	16899.205	16884.194	221	G
206	G	16839.341	16884.362	16996.258	16981.247	220	P
207	V	16938.409	16983.431	17095.326	17080.315	219	V
208	G	16995.431	17040.452	17152.348	17137.337	218	G
209	V	17094.499	17139.520	17251.416	17236.405	217	V
210	P	17191.552	17236.573	17308.438	17293.427	216	P
211	G	17248.573	17293.595	17405.490	17390.479	215	G
212	V	17347.642	17392.663	17504.559	17489.548	214	V
213	G	17404.663	17449.685	17561.580	17546.569	213	G
214	V	17503.732	17548.753	17660.649	17645.638	212	V
215	P	17600.784	17645.806	17717.670	17702.659	211	P
216	G	17657.806	17702.827	17814.723	17799.712	210	G
217	V	17756.874	17801.896	17913.791	17898.780	209	V
218	G	17813.896	17858.917	17970.813	17955.802	208	G
219	V	17912.964	17957.985	18069.881	18054.870	207	V
220	P	18010.017	18055.038	18126.903	18111.892	206	P
221	G	18067.038	18112.060	18223.955	18208.944	205	G
222	V	18166.107	18211.128	18323.024	18308.013	204	V
223	G	18223.128	18268.150	18380.045	18365.034	203	G
224	V	18322.197	18367.218	18479.114	18464.103	202	V
225	P	18419.249	18464.271	18536.135	18521.124	201	P
226	G	18476.271	18521.292	18633.188	18618.177	200	G
227	V	18575.339	18620.361	18732.256	18717.245	199	V
228	G	18632.361	18677.382	18789.278	18774.267	198	G
229	V	18731.429	18776.451	18888.346	18873.335	197	V
230	P	18828.482	18873.503	18945.368	18930.357	196	P
231	G	18885.503	18930.525	19042.420	19027.410	195	G
232	V	18984.572	19029.593	19141.489	19126.478	194	V
233	G	19041.593	19086.615	19198.510	19183.499	193	G
234	V	19140.662	19185.683	19297.579	19282.568	192	V
235	P	19237.714	19282.736	19354.600	19339.589	191	P
236	G	19294.736	19339.757	19451.653	19436.642	190	G
237	V	19393.804	19438.826	19550.721	19535.710	189	V
238	G	19450.826	19495.847	19607.743	19592.732	188	G
239	V	19549.894	19594.916	19706.811	19691.800	187	V
240	P	19646.947	19691.968	19763.833	19748.822	186	P
241	G	19703.968	19748.990	19860.885	19845.875	185	G
242	V	19803.037	19848.058	19959.954	19944.943	184	V
243	G	19860.058	19905.080	20016.975	20001.964	183	G
244	V	19959.127	20004.148	20116.044	20101.033	182	V
245	P	20056.179	20101.201	20173.065	20158.054	181	P
246	G	20113.201	20158.222	20270.118	20255.107	180	G
247	V	20212.269	20257.291	20369.186	20354.175	179	V
248	G	20269.291	20314.312	20462.208	20447.197	178	G
249	V	20368.359	20413.381	20552.276	20537.265	177	V
250	P	20465.412	20510.433	20642.298	20627.287	176	P
251	G	20522.433	20567.455	20739.350	20724.340	175	G
252	V	20621.502	20666.523	20778.419	20763.408	174	V
253	G	20678.523	20723.545	20835.440	20820.429	173	G
254	V	20777.592	20822.613	20934.509	20919.498	172	V
255	P	20874.644	20919.666	20991.530	20976.519	171	P
256	G	20931.666	20976.687	21088.583	21073.572	170	G
257	V	21030.734	21075.756	21187.651	21172.641	169	V
258	G	21087.756	21132.777	21244.673	21229.662	168	G
259	V	21186.824	21231.846	21343.741	21328.730	167	V
260	P	21283.877	21328.898	21400.763	21385.752	166	P
261	G	21340.898	21385.920	21497.816	21482.805	165	G
262	V	21439.967	21484.988	21596.884	21581.873	164	V
263	G	21496.988	21542.010	21695.905	21680.894	163	G
264	V	21596.057	21641.078	21795.974	21780.963	162	V
265	P	21693.109	21738.131	21899.995	21884.984	161	P
266	G	21750.131	21795.152	21907.048	21892.037	160	G
267	V	21849.199	21894.221	22006.116	21991.106	159	V
268	G	21906.221	21951.242	22063.138	22048.127	158	G
269	V	22005.289	22050.311	22162.206	22147.195	157	V
270	P	22102.342	22147.363	22219.228	22204.217	156	P
271	G	22159.363	22204.385	22316.261	22301.250	155	G
272	V	22258.432	22303.453	22415.349	22400.338	154	V
273	G	22315.453	22360.475	22472.370	22457.360	153	G
274	V	22414.522	22459.543	22571.439	22556.428	152	V
275	P	22511.574	22556.596	22628.460	22613.449	151	P
276	G	22568.596	22613.617	22725.513	22710.502	150	G
277	V	22667.664	22712.686	22824.581	22809.571	149	V
278	G	22724.686	22769.707	22881.603	22866.592	148	G
279	V	22823.754	22868.776	22980.671	22965.660	147	V
280	P	22920.807	22965.828	23037.693	23022.682	146	P
281	G	22977.828	23022.850	23134.746	23119.735	145	G
282	V	23076.897	23121.918	23233.814	23218.803	144	V
283	G	23133.918	23178.940	23330.835	23315.824	143	G
284	V	23232.987	23278.008	23389.904	23374.893	142	V
285	P	23330.040	23375.061	23446.925	23431.914	141	P
286	G	23387.061	23432.082	23543.978	23528.967	140	G
287	V	23486.129	23531.151	23643.047	23628.036	139	V
288	G	23543.151	23588.172	23700.068	23685.057	138	G
289	V	23642.219	23687.241	23799.136	23784.126	137	V
290	P	23739.272	23784.294	23896.158	23881.147	136	P
291	G	23796.294	23841.315	23993.211	23978.200	135	G
292	V	23895.362	23940.383	24092.279	24077.268	134	V
293	G	23952.383	23997.405	24199.301	24184.290	133	G
294	V	24051.452	24096.473	24208.369	24193.358	132	V
295	P	24148.505	24193.526	24265.390	24250.379	131	P
296	G	24205.526	24250.547	24362.443	24347.432	130	G
297	V	24304.594	24349.616	24461.512	24446.501	129	V
298	G	24361.616	24406.637	24518.533	24503.522	128	G
299	V	24460.684	24505.706	24617.601	24602.591	127	V
300	P	24557.737	24602.759	24674.623	24659.612	126	P
301	G	24614.759	24659.780	24771.676	24756.665	125	G
302	V	24713.827	24758.848	24870.744	24855.733	124	V
303	G	24770.848	24815.870	24927.766	24912.755	123	G
304	V	24869.917	24914.938	25026.834	25011.823	122	V
305	P	24966.970	25011.991	25083.855	25068.844	121	P
306	G	25023.991	25069.013	25180.908	25165.897	120	G
307	V	25123.059	25168.081	25279.977	25264.966	119	V
308	G	25180.081	25225.102	25336.998	25321.987	118	G
309	V	25279.149	25324.171	25436.066	25421.056	117	V
310	P	25376.202	25421.224	25493.088	25478.077	116	P
311	G	25433.224	25478.245	25590.141	25575.130	115	G
312	V	25532.292	25577.313	25689.209	25674.198	114	V
313	G	25589.313	25634.335	25746.231	25731.220	113	G
314	V	25688.382	25733.403	25845.299	25830.288	112	V
315	P	25785.435	25830.456	25902.320	25887.310	111	P
316	G	25842.456	25887.478	25999.373	25984.362	110	G
317	V	25941.525	25986.546	26098.442	26083.431	109	V
318	G	25998.546	26043.567	26155.463	26140.452	108	G
319	V	26097.614	26142.636	26254.532	26239.521	107	V
320	P	26194.667	26239.689	26311.553	26296.542	106	P
321	G	26251.689	26296.710	26408.606	26393.595	105	G

N-Term.	lon	a	c	y	z+2	C-Term.	lon
322	V	26350.757	26395.779	26497.674	26492.663	104	V
323	G	26407.779	26452.800	26564.696	26549.685	103	G
324	V	26506.847	26551.868	26663.764	26648.753	102	V
325	P	26603.900	26648.921	26770.786	26755.775	101	P
326	G	26660.921	26705.943	26871.838	26860.827	100	G
327	V	26759.990	26805.011	26976.907	26961.896	99	V
328	G	26817.011	26862.032	26973.928	26958.917	98	G
329	V	26916.079	26961.101	27072.997	27057.986	97	V
330	P	27013.132	27058.154	27170.018	27155.007	96	P
331	G	27070.154	27115.175	27272.071	27257.060	95	G
332	V	27169.222	27214.244	27326.139	27311.128	94	V
333	G	27226.244	27271.265	27383.161	27368.150	93	G
334	V	27325.312	27370.333	27482.229	27467.218	92	V
335	P	27422.365	27467.386	27539.251	27524.240	91	P
336	G	27479.386	27524.408	27636.303	27621.292	90	G
337	V	27578.455	27623.476	27735.372	27720.361	89	V
338	G	27635.476	27680.498	27792.393	27777.382	88	G
339	V	27734.544	27779.566	27891.462	27876.451	87	V
340	P	27831.597	27876.619	27948.483	27933.472	86	P
341	G	27888.619	27933.640	28045.536	28030.525	85	G
342	V	27987.687	28032.709	28144.604	28129.593	84	V
343	G	28044.709	28089.730	28201.626	28186.615	83	G
344	V	28143.777	28				

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Name: Constanze Zwies  
 Geburtsdatum: 16.03.1991  
 Geburtsort: Halberstadt  
 Elternzeit: 10/2020 – 10/2021

## Schulischer und beruflicher Werdegang

Seit 10/2021 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
 Agrochemisches Institut Piesteritz e.V. (AIP), Lutherstadt Wittenberg  
 Projekt: *“Identification of suitable parameters for the prediction of baking quality in wheat”*

07/2016 – **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
 08/2020 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, AG Pietzsch  
 Projekt: *“Designer proteins – Protein based binders”* (Arbeiten zur Promotion)

04/2016 – **Wissenschaftliche Hilfskraft**  
 06/2016 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie, AG Pietzsch  
 Projekt: *“Cascades of enzymatic and chemical oxidative catalysis in gas phase”*

06/2014 – **Auslandspraktikum**  
 09/2014 Westpommersche Technische Universität Stettin, Abteilung für Genetik und Tierzucht, gefördert durch IAESTE  
 Projekt: *“Influence of TCF12, CTNNAL1 and WNT10B gene polymorphisms on reproductive traits in pigs”*

2013 –2016 **Master-Studium:** Biochemie (Master of Science)  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Masterarbeit: „Untersuchungen zur Produktion und Aktivität der rekombinanten MMOR aus *Methylococcus capsulatus* Bath“, Betreuung: Prof. M. Pietzsch, Inst. für Pharmazie

12/2013 – **Praktikantin**  
 04/2014 Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI), Leipzig  
 Projekt: *“Pristane-induced Arthritis (PIA) in rats and analysis of functions of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in PIA-rats”*

2010 –2013 **Bachelor-Studium:** Biochemie (Bachelor of Science)  
 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Bachelorarbeit: „Untersuchungen zum Phosphoproteinmuster von Gerstenwurzeln bei Salzstress“, Betreuung: PD Dr. H.-P.Mock, IPK Gatersleben

08/2010 – **Praktikantin**  
 09/2010 Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Abteilung für Qualitätssicherung

2001 – 2009 **Bismarck-Gymnasium Genthin**  
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (2009)

---

 Ort, Datum

---

 Unterschrift (Constanze Zwies)